

(19) Japan Patent Office (JP)
(12) Laid-Open Patent Specification (A)
(11) Publication of Patent Application No. H5-170796
(43) Publication Date: July 9, 1993

(51) Int. Cl.⁵ Identifying Symbol Intra-Office Adjustment No. F1 Technical Details
C 07 K 7/08 ZNA 8318-4H
A 61 K 37/02 ADU 8314-4C
C 07 K 7/10 8318-4H
//C 07 K 99:00

Request for Examination: not requested

Number of Claims: 24

(Total number of pages in original Japanese-language document: 13)

(21) Application No. H3-355319

(22) Application Date: December 19, 1991

(71) Applicant: 000183370

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.
2-2-8 Doshu-cho, Osaka-shi
Osaka-fu, Japan

(72) Inventor: Ichiro Azuma

5-3-2 Ue-machi Magomanai, Minami-ku, Sapporo-shi
Hokkaido, Japan

(72) Inventor: Ikuo Saiki

3-5-12-6 Atsubetsu Kita, Atsubetsu-ku, Sapporo-shi
Hokkaido, Japan

(72) Inventor: Naoto Kususe

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.
3-1-98 Hinode Naka, Kasuga, Konohana-ku
Osaka-shi, Japan

(72) Inventor: Zenji Ikeda

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.
3-1-98 Hinode Naka, Kasuga, Konohana-ku
Osaka-shi, Japan

(72) Inventor: Keiichi Ono

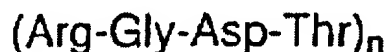
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.
3-1-98 Hinode Naka, Kasuga, Konohana-ku
Osaka-shi, Japan

**(54) [Title of the Invention] Cell Adhesion Active Peptide and Polymer
Modifier Thereof**

(57) [Abstract]

[Constitution] A high purity cell adhesion active modified peptide which is made up of a cell adhesion core sequence repeating structure and indicated by the formula (1)

[Chemical Formula 1]



[where n is an integer of 3 to 20]; and a polymer modified peptide obtained by polymer modification of the N-end amino group of this cell adhesion active peptide using a polyethylene glycol derivative.

[Effect] Cell adhesion active peptides have a strong cancer metastasis inhibition activity; polymer modified peptides of these also have a strong cancer metastasis inhibition action.

[Scope of Patent Claim]

[Claim 1]

A peptide which is indicated by the formula (I)

[Chemical Formula 1]



[where n is an integer from 3 to 20] which is characterized as having high purity and a pharmaceutically permitted salt thereof;

[Claim 2] The composition of Claim 1 wherein the purity of the peptide or of the pharmaceutically permitted salt thereof as determined by HPLC (high-performance liquid chromatography) is at least 90 %;

[Claim 3] The composition of Claim 1 wherein n in formula [I] is an integer from 3 to 11;

[Claim 4] The composition of Claim 1 where n in formula (I) is 3;

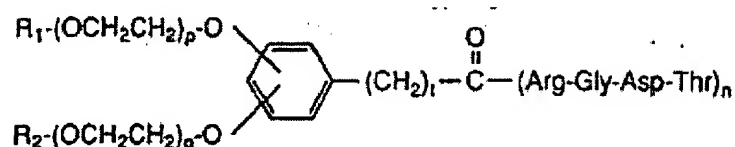
[Claim 5] The composition of Claim 1 wherein n in formula (I) is 5;

[Claim 6] The composition of Claim 1 wherein n in formula (I) is 7;

[Claim 7] The composition of Claim 1 wherein n in formula (I) is 9;

[Claim 8] The composition of Claim 1 wherein n in formula (I) is 11;

[Claim 9] A polymer modifying peptide and a pharmaceutically permitted salt thereof as indicated in formula (II)

[Chemical Formula 2]

[where n is an integer from 3 to 20; R₁ and R₂ are the same or different lower alkyl groups; p and t are any positive integers which are the same or different for which each polyethylene glycol part has a mean molecular weight of approximately 1000 to 12000; t is 0 or any positive integer.];

[Claim 10] The composition of Claim 9 wherein n in formula (II) is an integer from 3 to 11;

[Claim 11] The composition of Claim 9 wherein n in formula (II) is 3;

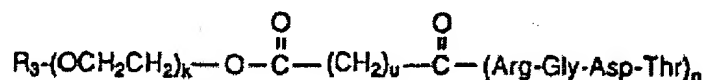
[Claim 12] The composition of Claim 9 wherein n in formula (II) is 5;

[Claim 13] The composition of Claim 9 wherein n in formula (II) is 7;

[Claim 14] The composition of Claim 9 wherein n in formula (II) is 9;

[Claim 15] The composition of Claim 9 wherein n in formula (II) is 11;

[Claim 16] A polymer modifying peptide and a pharmaceutically permitted salt thereof which is indicated by formula (III)

[Chemical Formula 3]

[wherein R₃ is a lower alkyl group; k is any positive integer for which the polyethylene core part has a mean molecular weight of approximately 1000 to 12000; n is a integer of 20 or less; u is any positive integer.]

[Claim 17] The composition of Claim 16 wherein n in formula (III) is an integer from 3 to 11;

[Claim 18] The composition of Claim 16 wherein n in formula (III) is 3;

[Claim 19] The composition of Claim 16 wherein n in formula (III) is 5;

[Claim 20] The composition of Claim 16 wherein n in formula (III) is 7;

[Claim 21] The composition of Claim 16 wherein n in formula (III) is 9;

[Claim 22] The composition of Claim 16 wherein n in formula (III) is 11;

[Claim 23] A cancer metastasis inhibitor which comprises the peptide or the pharmaceutically permitted salt thereof as indicated in Claim 1 through Claim 8

[Claim 24] A polymer modified peptide or the pharmaceutically permitted salt thereof as indicated in Claim 9 through Claim 22;

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Field] The present invention relates to a cell adhesion active peptide as well as polymer modifying peptide which is modified by a polyethylene glycol derivative which is a polymer modifying substance of the cell adhesion active peptide; and it further relates to a cancer metastasis inhibitor which comprises these peptides or the polymer modifying peptide thereof;

[0002]

[Description of the Prior Art] Fibronectin, laminin and vitronectin and the like contribute to adhesion between cells and interstitial tissue and consist of a protein which has a variety of types of bioactivity which are related to cell function in animal cells and referred to by its general name of cell adhesion active protein. For example, fibronectin is a protein which is synthesized in the liver and is present in the blood plasma in a concentration of approximately 0.3 mg/ml. Fibronectin forms a difibrin bond with a polypeptide A chain with a molecular weight of approximately 250 K and a polypeptide B chain with a molecular weight of approximately 240 K near the carboxyl end and dimerizes. The primary structure of fibrinectin has been determined by using the molecular cloning technique used by Koarnblihtt, A.R. *et al.*: **EMBO Journal**, **4**, 2519 (1985). The primary structure of laminin has been determined by Sasaki *et al.* (Sasaki, M. *et al.*, **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, **84**, 935 (1987); Sasaki, M. *et al.* **Journal of Biological Chemistry**, **262**, 17111 (1987); and the primary structure of vitronectin has been determined by Suzuki *et al.*: **EMBO Journal**, **4**, 1755 (1985). Research has been carried out on the bonding sites which are involved in cell adhesion activity and the bonding sites for bacteria for both the A chain and B chain have been determined by research carried out on bonding to fragments of heparin, collagen, cells and bacteria obtained by limited decomposition of fibronectin by protease (Yamada, L. M.: **Annual Review of Biochemistry**, **52**, 761 (1983)). The core sequence of the cell bonding sites was clarified in 1984 as being Arg-Gly-Asp (RGD) (Pierschbachr., M.D. *et al.*: **Nature**, **309**, 30 (1984). It has been clarified that this RGD sequence also exists in vitronectin and other adhesive proteins.

[0003] Fibronectin bonds with the receptors of the cells adhering via the aforementioned core sequence and transmits information to the adhering cells. It is thought that these

also have a bonding capacity with heparin, collagen, fibrin and other biopolymers and that they contribute to the adhesion between cells and the interstitial tissue and to cell differentiation and cell growth (Yamada, K.M.: **Annual Review of Biochemistry**, **52**, 961 (1983)). Thus, the cell adhesion active protein has a variety of biological activities so that its application to medicine is currently the subject of research. For example, when the amount of fibronectin in the blood plasma declines, the function of the reticuloendothelial group declines as well. In this case, septicemia resulting from surgery and burns, disseminated intravascular coagulation, serious infectious diseases and surgical shock are examples. Administration of fibronectin is thought to be effective in improving these symptoms. Fibronectin stimulates the migration capacity of fibroblasts and macrophages so that its application in the healing of wounds and regulation of the immunological competence function is currently under investigation. In particular, local treatment of corneal damage which makes use of this healing promotion effect on wounds has already been tested (Fujikawa, L.S. *et al.*: **Laboratory Investigations**, **45**, 120 (1981).

[0004] The cell adhesion activity protein also is the subject of attention as a substance which is related to cancer metastasis. At this time, cell adhesion molecules such as fibronectin and laminin are present, the cells form multiple cell lumps thus facilitating the proliferation and survival of cancer cells. Actually, it was found that when laminin is mixed with cancer cells and administered to animals, the cancer metastasis is reinforced. Incidentally, it has been reported that the protease fragments which are derived from laminin conversely have a cancer metastasis inhibition activity (Barsky, S.H. *et al.* **Journal of Clinical Investigations**, **74**, 843 (1984). Likewise, it has been confirmed that tripeptide Arg-Gly-Asp which is a fibronectin adhesion core (Humphries, M.J. *et al.*: **Science**, **233**, 467 (1986) and the triptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg which is a laminin adhesion core (Iwamoto, Y. *et al.*: **Science**, **238**, 1132 (1987) inhibit cancer metastasis. These polypeptides which have an adhesion core repeating structure are also known to have a stronger platelet agglutination inhibition activity and a stronger cancer metastasis inhibition activity than the mono peptides. (Azuma *et al.*, [Japanese] Laid-Open Patent Specification No. H2-174798).

[0005] Meanwhile, problems are encountered when administering peptide drugs to organisms in that the path clearance is extremely fast and there is antigenicity in addition to human type natural protein. A well-known and useful means of solving these problems involves modifying protein and peptide using a polyethylene glycol derivative, delaying the path clearance inside the organism and lowering the antigenicity. (**Japanese Journal of Cancer Research**, **77**, 1264 (1986); [Japanese] Laid-Open Patent Specification No. S56-23587; [Japanese] Laid-Open Patent Specification No. S61-178926; **Cancer Biophysics**, **7**, 175 (1984); [Japanese] Laid-Open Patent Specification No. S62-115280.

[0006]

[Problems Which the Present Invention is Intended to Solve] As indicated previously, the cell adhesion active protein of fibronectin and laminin and others has a variety of types of biological activity and there has been a need to develop a technique which could be used for application of the related substances as a drug. In particular, the cancer metastasis inhibition action of the adhesion core of fibronectin, laminin and the like is

thought to be highly applicable as a drug. However, since the cell adhesion activity of said core sequence is insufficient, the cancer metastasis inhibition action of these is not sufficient to apply to an actual medication and there has been a need to develop a substance with an even higher activity. However, the cell adhesion activity protein is a natural substance so that there are limitations as to its supply. Since it is a glycoprotein, the methods used to synthesize it as well as produce it efficiently using genetic engineering are extremely difficult. There is a well-known method of resolving the aforementioned problems which involves increasing the cell adhesion activity making these into Arg-Gly-Asp polymers, Arg-Gly-Asp-Ser polymers and Arg-Gly-Asp-Thr polymers which have a cell adhesion core sequence repeating structure ([Japanese] Laid-Open Patent Specification No. H2-174798; **Japanese Journal of Cancer Research**, **81**, 660 (1990); **Cancer Research**, **49**, 3815 (1989); **International Journal of Biological Macromolecules**, **11**, 226 (1989)). Even in the aforementioned literature, producing polypeptides involves polymerization using a continuous polymerization method using diphenyl phosphoryl azide (DPPA) on the corresponding mono-peptides. Synthesis of the Arg-Gly-Asp-Thr polymer was tried using the method indicated in the aforementioned literature. The results of analysis using reverse phase high-speed chromatography clarified that the reaction product was a mixture of many types of compounds which were assumed to be many different kinds of polymers and byproducts when the polymers were synthesized.

[0007] Thus, it was extremely difficult to control the degree of polymerization in order to obtain polymer peptides when the prior-art method was used. It was also clarified that it was extremely difficult to obtain only peptides which were actually homogeneous polymer peptides. In addition, when this production method is used, it is assumed that it will be difficult to obtain compounds with a constant quality. These will be problematical when considered as a medication. In addition, it is presently impossible to use the prior-art method to obtain peptides with a distinct molecular weight with a cell adhesion core repeating structure by industrial detachment and refining means (recrystallization, reprecipitation, ultrafiltration and the like) from a peptide mixture which comprises a variety of compounds with a molecular weight which extends over this wide range. In addition, when making a derivative (for example, modifying using a polymer modification agent) using as raw material peptide mixtures which comprise a variety of compounds with this type of wide-ranging molecular weight, it is clear that the same problem also arises for the derivative obtained. This type of peptide is unsuitable as a raw material for the present invention. As a result, one of the objects of the present invention is to provide a high purity polypeptide which has a cell adhesion active protein adhesion core amino acid sequence repeating structure. This is known to have a high activity by providing the aforementioned type of adhesion core amine acid sequence with a repeating structure and there is a need for a compound with a strong activity for use as a medication. Therefore, it is another object of the present invention to provide a modified polypeptide which is obtained by condensation of the polyethylene glycol derivative with the aforementioned high purity polypeptide to obtain a compound with a still stronger biological activity.

[0008]

[Means Used to Solve the Problems] The inventors carried out a great deal of research on solving the aforementioned problems and were able to obtain the high purity cell adhesion active peptide (peptide (1)) indicated in formula (I). They were also successful in bringing about a high activation by producing a polymer modifier using polyethylene glycol and after repeated efforts, they attained the present invention.

[0009] The present invention is a peptide (peptide (I)) which has high purity and which is (1) indicated by the formula (I)

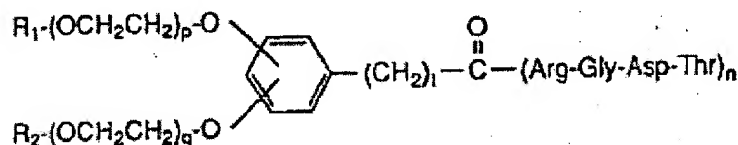
[Chemical Formula 4]



[where n is an integer from 3 to 20]

(2) and a polymer modified peptide (modified peptide (II)) which is indicated by formula (II)

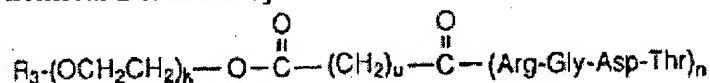
[Chemical Formula 5]



[where n is an integer from 3 to 20; R₁ and R₂ are the same or different lower alkyl groups; p and q are any same or different positive integers when each of the polyethylene glycol parts has a mean molecular weight of approximately 1000 to 12000; t is 0 or any positive integer.]; and

(3) a polymer modified peptide (modified peptide (III)) which is indicated by formula (III)

[Chemical Formula 6]



[where R₃ is a lower alkyl group; k is any positive integer wherein the polyethylene glycol parts have a mean molecular weight of approximately 1000 to 12000], a cancer metastasis inhibition agent which comprises (4) peptide (I) and a cancer metastasis inhibition agent which comprises (5) modified peptide (II) or (III).

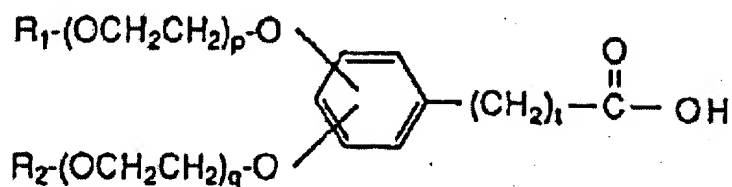
[0010] In the aforementioned formula, the positive integer indicated as n should be 3 to 11; the lower alkyl group indicated by R₁, R₂ and R₃ may be straight chain or branching, however, methyl, ethyl, isopropyl, n-butyl and other lower alkyl groups with a carbon

number of 1 to 4 are suitable. In addition, the molecular weight of the polyethylene glycol parts should be 3000 to 7000 and the integer indicated by t should be 0 to 10; the positive integer indicated by u should be 1 to 10. An L-type amino acid and a D-type amino acid may be included in the peptide and polymer modified peptide in the present invention, while the L-type amino [acid] is particularly suitable. The compound in the present invention is used as a medication so that a pharmaceutically permitted salt such as hydrochloride, sulfate and other inorganic salts, acetate, trifluoro acetate, lactate, oxalate and other organic salts may be used and transformation to these salts may be carried out using the usual means.

[0011] The peptide (I) in the present invention increases the purity of the desired compound thereby differing from the method which involves polymerizing monomers of Arg-Gly-Asp-Thr. When a method is used in which the primary sequence of the intermediate is clear in each of the stages of the synthesis, synthesis can be carried out using a method which makes up the primary sequence of the desired substance. There is a well-known method of synthesis which uses the chemical synthesis method as well as the genetic engineering method, although synthesis can be carried out by using either of these methods. The solution phase method and the solid phase method are well-known as chemical synthesis methods, however, synthesis can be carried out using either of these methods. There is also a well-known step-wise extension method which involves successively building the desired primary sequence from the N-end or the C-end and the filament condensation method which divides the desired primary sequence into the appropriate fragments, condenses these fragments and constructs the desired substance. However, either of these methods may be used or they may be used in combination, thereby carrying out the synthesis. Also, if necessary, a functional group (amino group, carboxyl group, guanidine group, hydroxyl group) may be used for protection. Regarding the method of condensation, protective group, reaction conditions and the like, synthesis may be carried out using the usual method for synthesis of the peptides, the protective group, the reaction conditions and the like as indicated in **Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis** (Maruzen Publishers), **Experiments and Lectures in Biochemistry • Vol. 1 Chemistry of Proteins IV** (Tokyo Kagaku Dojin Publishers) and the like. If necessary, refining may be carried out in accordance with reverse phase HPLC, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography and other conventional peptide refining methods. The purity of the cell adhesion active peptide obtained in this way should be at least 90 % of the surface ratio and preferably 95 % of the surface ratio. The cell adhesion active peptide in the present invention inhibits cancer metastasis more effectively than polymers made of multiple constituents whose molecular weight is not clear and which were produced using a method which involves polymerization of Arg-Gly-Asp-Thr. In addition, the cell adhesion active peptides in the present invention are extremely useful as a raw material peptide for induction to obtain a compound with a strong biological activity as a medication due to its high purity (for example, modification using a polymer modifying agent.)

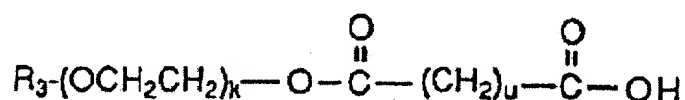
[0012] The modifying peptide (II) or (III) in the present invention is produced by reacting a polyethylene glycol derivative (IV) carboxyl group activated body which is indicated by formula (IV)

[Chemical Formula 7]



[where R_2 , R_3 , p , q and t all mean the same as they did for formula (II)] or the polyethylene glycol derivative (V) carboxyl group activator which is indicated by formula (V)

[Chemical Formula 8]



[where R_3 , k and u mean the same as they did in formula (III)] and an amine group. The activation method used for the polyethylene glycol derivative (II) or (V) may involve a greater degree of activation than that of the usual carboxyl group activation method, for example, the carboxyl group activation method indicated in **Experiments and Lectures in Biochemistry, Vol. 1, Chemistry of Proteins IV** (Tokyo Kagaku Tojin), **Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis** (Izumiya *et al.*, Maruzen Publishers). In reacting the carboxyl group activator of the polyethylene glycol derivative (II) or (V) with the peptide (I), the reaction temperature may be any temperature as long as the peptide (I) is not deactivated, such as a temperature range of 0 to 25°C. The polyethylene glycol derivative (II) or (V) which is used in the present invention may be reacted at a pH of 4.5 or greater. As a result, the pH of the reaction may be 4.5 or greater as long as the peptide is not deactivated and a pH in the range of 6 to 9 is suitable.

[0013] Any solvent may be used in the reaction as long as it does not interfere with the reaction. Examples of such solvents are a phosphoric acid buffer solution, a boric acid buffer solution, a sodium carbonate aqueous solution, a sodium hydrogen carbonate aqueous solution, an N-ethyl morpholine—acid acetic buffer solution, a sodium maleic acid buffer solution, a sodium acetic acid buffer solution and other buffer solutions. Organic solvents which do not deactivate the peptide and which are inert in the reaction such as methanol, ethanol, propanol and other lower alcohols and acetonitriles, dioxane, tetrahydrofuran and the like may be added. A reaction time of 1 to 72 hours is sufficient. After the reaction has been completed, the desired modified peptide can be obtained by refining by salting out, gel filtration, ion replacement chromatography, adsorption chromatography, affinity chromatography, ultrafiltration, reverse phase HPLC

and other well-known methods of refining protein and the desired modified peptide can be obtained.

[0014] The high purity peptide (I) in the present invention has a repeating cell adhesion active protein core sequence and it is thought to adhere to the cells due to the same mechanism as the cell adhesion active protein through the core sequence. Therefore, a variety of different biological activities are indicated as the cell adhesion active protein agonist or antagonist. In particular, the peptide (I) in the present invention has a stronger cancer metastasis inhibition action which is several times that of the cell adhesion active protein core sequence. In addition to this, the inhibition action and other types of biological activity brought about by platelet agglutination of the cancer cells which arises in the blood capillaries has also been confirmed. The peptide (I) which has been modified by the polyethylene glycol derivatives (II) and (V) is a compound which is considerably more stable than the corresponding unmodified peptide (I) and it has a stronger cancer metastasis inhibition activity than the unmodified peptide (I). This means that the polyethylene glycol modified peptide has a pathway clearance which is markedly delayed (that is, its persistence is prolonged) and has a physiological activity which is effective for long periods of time. Moreover, the modified peptide in the present invention has the physiological activity of the unmodified peptide (I) as is. The peptide and polymer modified peptide in the present invention are extremely effective as medications for humans and for animals. The peptide and the polymer modified peptide in the present invention are usually administered orally or non-orally to mammals (such as cows, horses, sheep, humans and others) as a formulation consisting of appropriate drug constituents. When administered as a cancer metastasis inhibitor, the peptide and polymer modified peptide in the present invention are determined within a range of 0.2 $\mu\text{g/kg}$ to 400 mg/kg based on the symptoms, age, body weight and other factors and is administered once a day or several times per day.

[0015]

[Practical Embodiments of the Invention] Next, we shall explain the present invention more specifically by referring to practical embodiments of it. Nevertheless, it should by no means be construed that the present invention is limited to these practical embodiments. Further, in the following practical embodiments, the amino acid analytical values for the amino acid analytical values for the peptides or polymer modified peptides indicate the amino acid analytical values in these peptides or polymer modified peptide acid decomposed bodies (decomposed bodies of 6N acetic acid—phenol after processing for 24 hours at 110°C). Abbreviations for these are indicated below

Boc : benzyl oxycarbonyl
 cHex : cyclohexyl
 Bzl : benzyl
 Tos : p-toluene sulfonyl
 Pac : phenacyl

[0016] Practical Embodiment 1

Preparation of (Arg-Gly-Asp-Thr)₅

a) Boc-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₂ -OPac

We dissolved 17.24 g (0.017 mol) of Boc-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₂-Opac in 70 ml of acetonitrile and dropped 13.36 g (0.139 mol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature. Then, we stirred it for one hour at room temperature. We brought it to a sub-zero temperature a second time and dropped 70 ml of DMF. We dropped 12.3 g (0.020 mol) of triethyl amine. Next, we added 16.0 g (0.018 mol) of Boc-Asp (OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly-OH, 2 [number illegible]. 72 g (0.020 mol) of 1-hydroxy benzotriazole ("HOB"); and 3.12 g (0.020 mol) of 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide ("WSC") at a sub-zero temperature and stirred this for 30 minutes. After that, we stirred it for 3 hours at room temperature. We poured the reaction solution into 2 [number illegible] of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at room temperature. Then, we filtered out the precipitate, washed it in water and then in ether. We dried it and obtained 30.2 g of the compound indicated in the title.

[0017]

b) Boc-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₂-OH

We dissolved 30.80 g (0.018 mol) of compound (a) in Practical Embodiment 1 in 200 ml of 90 % acetic acid, added 57.2 g (0.883 mol) of zinc powder in three batches at five minute intervals at a sub-zero temperature, returned it room temperature and stirred it vigorously. Three hours later, we carried out "selite" filtration of the reaction solution and poured the filtrate into 2.2 liters of 1 % brine. We stirred it at a sub-zero temperature and then filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 27.1 g of the compound indicated in the title.

[0018]

c) Boc-Arg (Tos)Gly-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos)Gly)₂-OPac

We dissolved 15.75 g (9.0 mmol) of the compound in Practical Embodiment 1 (a) in 150 ml of acetonitrile and dropped 13.82 g (0.144 mol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature. Then, we stirred it for one hour at room temperature. We again brought it to a sub-zero temperature, dropped 150 ml of DMF and dropped 13.64 g (0.135 mol) of triethyl amine. Next, we added 4.78 g (0.010 mol) of Boc-Arg (Tos) Gly-OH, 1.47 g (0.011 mol) of HOBt, 1.69 g (0.011 mol) of WSC at a sub-zero temperature and stirred it for 30 minutes. Then, we stirred it at room temperature for 3.5 hours. We poured the reaction solution into 2.5 liters of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature, filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 18.0 g of the compound indicated in the title.

[0019]

d) Boc-Arg (Tos) Gly-(Asp (OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₂-OH

We dissolved 17.52 g (8.3 mmol) of compound (c) in Practical Embodiment 1 in 450 ml of 90 % aqueous acetic acid. We added 7.0 g (0.415 mol) of zinc powder in three batches at five minute intervals at a sub-zero temperature. We returned this to room temperature and stirred it vigorously. One hour later, we carried out "selite" filtration of the reaction solution and poured the filtrate into 2.5 liters of 1 % brine. We stirred this at a sub-zero temperature and then filtered out the precipitate. We washed it with water and then with ether and dried it. We obtained 18.7 g of the compound indicated in the title

[0020]

e) Boc-Arg (Tos) Gly-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₄-OH

We dissolved 13.79 g (7.9 mmol) of the compound (a) in Practical Embodiment 1 in 100 ml of acetonitrile and dropped 15.17 g (0.158 mol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature and then stirred for one hour at room temperature. We returned it to a sub-zero temperature and dropped 20 ml of DMF and then dropped 15.16 g (0.150 mol) of triethyl amine. Next, we added 16.5 g (8.3 mmol) of the compound in (d) in Practical Embodiment 1, 1.23 g (9.1 mmol) of HOBt and 1.41 g (9.1 mmol) of WSC at a sub-zero temperature. We stirred it for 30 minutes and stirred it for 1.5 hours at room temperature. We poured the reaction solution into 2.5 liters of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature and filtered out the precipitate. We washed it with water and then with ether, dried it and obtained 29.2 g of the compound indicated in the title.

[0021]

f) Boc-Arg (Tos) Gly-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₄-OH

We dissolved 28.97 g (8 mmol) of the compound (e) in Practical Embodiment 1 in a mixed solvent made up of 1.3 liter of 90 % aqueous acetic acid and 250 ml of trifluoro ethanol. We added 104 g (1.6 mol) of zinc powder in three batches at five minute intervals at room temperature, heated this to 45° and stirred it vigorously for two hours. We carried out "selite" filtration and dropped the filtrate in 2.5 liter of 1 % brine and stirred it at a sub-zero temperature. Then, we filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether. We dried it and obtained 22.2 g of the compound indicated in the title.

[0022]

g) Boc-(Arg (Tos) Gly Asp (OcHex) Thr (Bzl))₅ OBzl

We dissolved 1.91 g (3.2 mmol) of the Boc-Asp (OcHex) Thr (Bzl)-OBzl in 100 ml of acetonitrile. We dropped 2.46 g (22.4 mmol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature and then stirred it for one hour at room temperature. We again brought it to a sub-zero temperature and dropped 225 ml of DMF and 25 ml of N-methyl-2-pyrrolidinone and again dropped 1.94 g (19.2 mmol) of trimethyl amine. Next, we added 12.0 g (3.4 mmol) of compound (f) in Practical Embodiment 1, 0.55 g (4.0 mmol) of HOBt and 0.64 g (4.0 mmol) of WSC at a sub-zero temperature. We stirred this for 30 minutes and then stirred it for 3 hours at room temperature. We poured the reaction solution in 2 liter of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature. We filtered out the precipitate and washed it with water and then with ether. We dried it and obtained 12.4 g of the compound indicated in the title.

[0023]

h) (Arg-Gly-Asp-Thr)₅

We subjected 160 ml of anhydrous hydrogen fluoride to reduced pressure in the presence of 25 ml of anisole and 7 ml of methyl ethyl sulfide and added 6.0 g of the compound (g) in Practical Embodiment 1. We processed this for 1.5 hours at -20°C and for 22 hours at 0°C. We removed the hydrogen fluoride while at reduced pressure at 0° and triturated the residue with ether. We dissolved the resulting solid in 5 % aqueous

acetic acid, filtered out the insoluble matter, freeze-dried the filtrate and obtained 3.70 g of the compound in the title in the form of a rough product. We refined this rough product using reverse phase HPLC (column: YMC-ODS, 50 mm ϕ x 500 mm, 15 to 30 μ ; flow rate: 15 ml/min.; detection wavelength: 220 nm; effluent: (A) water -0.1 % trifluoro acetic acid; (B) acetonitrile -0.1 % trifluoro acetic acid; gradient: (B) 0 % \rightarrow (180 minutes) 6 % \rightarrow (240 minutes) 10 %); and we obtained 870 mg of the compound indicated in the title (HPLC area ratio of 97.2 %).

MS (FAB) m/e 2166 (M + H⁺)

Amino acid analytical values: Asx (4.83), Gly* (5.00), Arg (4.79), Thr (4.75) [Gly* were calculated as the standard].

Reverse phase HPLC

Column: YMC-ODS, 5 μ

4.6 mm ϕ x 250 mm

Effluent: gradient

Solution A: water - 0.1 % trifluoro acetic acid

Solution B: acetonitrile - 0.1 % trifluoro acetic acid

Initial concentration of Solution B: 7 %

Concentration gradient: 0.5 % / minute

Flow rate: 1 ml/minute

Detection wavelength: 220 nm

Retention time: 12.55 minutes

[0024] Practical Embodiment 2

Producing (Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁

a) Boc-(Asp (OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₂ -Asp (OcHex) Thr (Bzl) - Bzl

We dissolved 2.39 g (4.0 mmol) of Boc-Asp (OcHex) Thr (Bzl) in 30 ml of acetonitrile and dropped 3.08 g (32 mmol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature. Then, we stirred it for one hour at room temperature. We again brought it to a sub-zero temperature and dropped 50 ml of DMF. We dropped 2.83 g (28 mmol) of triethyl amine. Next, we added 6.85 g (4.2 mmol) of the compound in Practical Embodiment 1 (b), 654 mg (4.8 mmol) of HOBt, 841 mg (4.8 mmol) of WSC) at a sub-zero temperature and stirred it for 30 minutes. Then, we stirred it for 3 hours at room temperature. We poured the reaction solution in 700 ml of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature. Then, we filtered out the precipitate, washed it in water and then in ether and dried it. We obtained 7.65 g of the compound indicated in the title.

[0025]

b) Boc-(Asp)OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly)₄ -Asp (OcHex) Thr (Bzl)-OBzl

We suspended 7.95 g (3.8 mmol) of the compound in Practical Embodiment 2 (a) in 70 ml of acetonitrile and dropped 5.80 g (60.3 mmol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature. Then, we stirred it for one hour at room temperature. We again brought it to a sub-zero temperature and dropped 120 ml of DMF and dropped 5.72 g (56.6 mmol) of triethyl amine. Next, we added 6.45 g (4.0 mmol) of the compound in Practical Embodiment 1 (b), 616 mg (4.6 mmol) of HOBt and 708 mg (4.6 mmol) of

WSC. We stirred this for 30 minutes and then stirred it for 3.5 hours at room temperature. We poured the reaction solution into 1600 ml of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature and filtered out the precipitate. We washed it with water and then with ether, dried it and obtained 13.1 g of the compound indicated in the title.

[0026]

c) Boc-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly₅ -Asp (OcHex) Thr (Bzl)-OBzl

We suspended 13.0 g (9.0 mmol) of the compound in Practical Embodiment 2 (b) in 70 ml of acetonitrile. We dropped 7.25 g (111 mmol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature and then stirred it for one hour at room temperature. We again brought it to a sub-zero temperature and dropped 100 ml of N-methyl-2-pyrrolidinone and dropped 10.9 g (108 mmol) of triethyl amine. Next, we added 6.15 g (3.8 mmol) of the compound in Practical Embodiment 1 (b), 587 mg (4.3 mmol) of HOBt and 675 mg (4.3 mmol) of WSC. We stirred it for 30 minutes and then stirred it for four hours at room temperature. We poured the reaction solution into 1.6 liter of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature. Then we filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 16.3 g of the compound indicated in the title.

[0027]

d) H-(Asp(OcHex) Thr (Bzl) Arg (Tos) Gly₆ -Asp (OcHex) Thr (Bzl)-OBzl

We suspended 16.0 g (3.1 mmol) of the compound in Practical Embodiment 2 (c) in 130 ml of trifluoro acetic acid and stirred it for 3.5 hours at a sub-zero temperature. We poured the reaction solution into 1 liter of ether at a sub-zero temperature, stirred it for 30 minutes and filtered out the precipitate. We dissolved this precipitate in 300 ml of DMF and dropped 3.16 g (31 mmol) of triethyl amine at a sub-zero temperature. Then, we stirred it for 30 minutes. We poured the reaction solution into 1.5 liter of 1 % brine and stirred it for 30 minutes. We filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 15.0 g of the compound indicated in the title.

[0028]

e) Boc-(Arg(Tos) GlyAsp (OcHex) Thr (Bzl)₁₃ -OBzl

We dissolved 10.4 g (2.96 mmol) of the compound in Practical Embodiment 1 (f) and 14.90 g (2.96 mmol) of the compound in Practical Embodiment 2 (d) in a mixed solvent of 200 ml of DMF and 200 ml of N-methyl pyrrolidinone and added 485 mg (3.59 mmol) of HOBt and 690 mg (3.59 mmol) of WSC • HCl at 5 to 10°C and stirred this for 3 hours at room temperature. We poured the reaction solution into 3 liters of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature. Then, we filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 22.6 g of the compound indicated in the title.

[0029]

f) (Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁

We carried out the same processing as in Practical Embodiment 2 (e) and added 7.50 g of the compound in Practical Embodiment 2 (e) to while subjecting 80 ml of

anhydrous hydrogen fluoride to reduced pressure in the presence of 12 ml of anisole and 2 ml of methyl ethyl sulfide at -78°C and obtained 4.50 g of the rough product compound indicated in the title.

[0030]

Practical Embodiment 3

Producing (Arg-Cly-Asp-Thr)₇

We dissolved 1.22 g (0.24 mmol) of a) Boc-(Arg(Tos)GlyAsp(OcHex) Thr (Bzl))₇-OBzl and 129 mg (0.27 mmol) of Boc-Arg (Tos)Gly-OH in a mixed solvent of 5 ml of DMF and 25 ml of N-methy-2-pyrrolidinone and added 39 mg (0.29 mmol) of HOBt and 56 mg (0.29 mmol) of WSC • HCl. We stirred this for 30 minutes and then stirred it for 4.5 hours at room temperature. We poured the reaction solution into 300 ml of 1 % brine, stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature and then filtered out the precipitate. We washed it in water and then in ether, dried it and obtained 1.23 g of the compound indicated in the title.

[0031]

b) (Arg-Gly-Asp-Thr)₇

We carried out the same processing as in Practical Embodiment 1 (f) and added 1.23 g of the compound in Practical Embodiment 3 (a) and subjected 40 ml of anhydrous hydrogen fluoride to reduced pressure in the presence of 6 ml of anisole and 1.5 ml of methyl ethyl sulfide at -78°C and obtained 728 mg of a rough product of the compound indicated in the title. We refined 728 mg of the rough product using reverse phase HPLC (column : YMC-ODS 30 mmφ x 250 mm, 15 to 30 μ; flow rate: 7 ml/min; detection wavelength : 220 nm; effluent : (A) water - 0.1 % trifluoro acetic acid (B) acetonitrile to 0.1 % trifluoro acetic acid; gradient : (B) 0 % → (180 minutes) 7 % → (60 minutes) 10 % → (120 minutes) 14 %) and obtained 191 mg of the compound indicated in the title (HPLC surface ratio of 95.5 %).

MS (FAB) m/e 3025 (M+H⁺)

Amino acid analytical values : Asx (7.17), Gly* (7.00); Arg (7.11), Thr (7.10) [Gly* were calculated as standards]

Reverse phase HPLC

Analytical conditions: same as Practical Embodiment 1

Retention time: 14.92 minutes

[0032]

Practical Embodiment 4

Producing (Arg-Gly-Asp-Thr)₃

a) Boc-(Arg(Tos)Gly Asp(OcHex) Thr (Bzl))₃-OBzl

We suspended 1.80 g (0.85 mmol) of the compound in Practical Embodiment 2 (a) and dropped 1.23 g (12.8 mmol) of methane sulfonic acid at a sub-zero temperature. Then we stirred it for 3.5 hours at room temperature. We again brought it to a sub-zero temperature and dropped 1.21 g (21 mmol) of triethyl amine. Next, we added 433 mg (0.90 mmol) of Boc-Arg (Tos) Gly-OH, 138 mg (1.02 mmol) of HOBt and 159 mg (1.02 mmol) of WSC. We stirred this for 30 minutes and stirred it for 3 hours at room temperature. We poured the reaction solution into 300 ml of 1 % brine and stirred it for

30 minutes at a sub-zero temperature. We filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 2.03 g of the compound indicated in the title.

[0033]

b) (Arg-Gly-Asp-Thr)₃

We carried out the same processing as in Practical Embodiment 1 (f) and added 1.80 g of the compound in Practical Embodiment 4 (a) and subjected 40 ml of anhydrous hydrogen fluoride to reduced pressure in the presence of 6 ml of anisole and 1.5 ml of methyl ethyl sulfide at -78°C and obtained 1.00 g of the rough product. We refined 1.00 g of this rough product twice in the same way as in Practical Embodiment 3 (b) using reverse phase HPLC (unlike Practical Embodiment 3 (b) only for the gradient conditions, (B) 0 % → (180 minutes) 11 % → (120 minutes) 15 %) and obtained 143 mg of the compound indicated in the title (HPLC surface ratio of 97.4%).

MS (SIMS) m/e 1306 (M+H⁺)

Amino acid analytical values: Asx (3.03), Gly* (3.00), Arg (2.99), Thr (3.03) [Gly* calculated as standard].

Reverse phase HPLC

Analytical conditions: same as Practical Embodiment 1

Retention time: 7.75 minutes

[0034] Practical Embodiment 5

Producing (Arg-Gly-Asp-Thr)₉

a) Boc-(Arg(Tos) Gly Asp (OxHex) Thr (Bzl))₉ -OBzl

We dissolved 629 mg (0.32 mmol) of the compound in Practical Embodiment 1 (d) and 1.51 g (0.30 mmol) of the compound in Practical Embodiment 2 (d) in 40 ml of DMF. We added 49 mg (0.36 mmol) of HOBt and 69 mg (0.36 mmol) of WSC • HCl at a sub-zero temperature and reacted this for four hours at room temperature. We poured the reaction solution into 300 ml of 1 % brine and stirred it for 30 minutes at a sub-zero temperature. We filtered out the precipitate, washed it with water and then with ether, dried it and obtained 1.83 g of the compound indicated in the title.

[0035] b) (Arg-Gly-Asp-Thr)₉

We carried out the same processing as in Practical Embodiment 1 (f) and added 1.50 g of the compound in Practical Embodiment 5 (a) and subjected 40 ml of anhydrous hydrogen fluoride to reduced pressure in the presence of 6 ml of anisole and 1.5 ml of methyl ethyl sulfide at -78°C and obtained 940 mg of this rough product. We refined 440 mg of this rough product using reverse phase HPLC in the same way as in Practical Embodiment 3 (b) (only the gradient conditions are different from Practical Embodiment 3 (b), (B) 0 % → (180 minutes) 8 % → (180 minutes) 17 %) and we obtained 74 mg of the compound indicated in the title. (HPLC surface ratio of 100 %).

MS (FAB) m/e 3884 (M + H⁺)

Amino acid analytical values: Asx (9.24), Gly* (9.00); Arg (9.32), Thr (9.39) [Gly* is calculated as standard]

Reverse phase HPLC

Analytical conditions: the same as for Practical Embodiment 1

Retention time: 16.06 minutes

[0036] Practical Embodiment 6

3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid modification

(ArgGlyAspThr)₂₂

We dissolved 300 mg of the (ArgGlyAspThr)₁₁ produced in Practical Embodiment 2 (f) in 30 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21) and then added 2.53 g (4 eq. relative to amino group) of 3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 10000) and stirred it for two hours at room temperature. We adjusted the pH to 5.0 using 1 N hydrochloric acid. Then, we filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m) and diluted this with distilled water so that the overall capacity was 150 ml. We refined this solution using reverse phase HPLC in the same way as in Practical Embodiment 1 (b) (however, the gradient conditions are as follows: (B) 0 % \rightarrow (60 minutes) 30 % \rightarrow (180 minutes) 35 % \rightarrow (120 minutes). We freeze-dried the desired fraction and obtained 495 mg of the compound indicated in the title.

[0037] Amino acid analytical values: Asx (11.0), Gly* (11.0), Arg (10.8), Thr (10.3)

* Standard amino acid

Reverse phase HPLC

Column: YMC-ODS, 5 μ

4.6 mm ϕ x 250 mm

Effluent: gradient

A solution: water – 0.1 % trifluoro acetic acid

B solution; acetonitrile - 0.1 % trifluoro acetic acid

Initial B solution concentration: 30 %

Concentration gradient: 1 % /minute

Flow rate: 1 ml / minute

Detection wavelength : 10 nm

Retention time: 16.35 minutes

GPC

Column : TSK gel G3000SW

7.5 mm ϕ x 600 mm (manufactured by Toso Ltd.)

Effluent: 0.2 M brine (containing 5 % ethanol)

Flow rate: 0.6 ml/minute

Detection wavelength: 10 nm

Retention time: 25.63 minutes

[0038] Practical Embodiment 7

3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid modification

(ArgGlyAspThr)₅

We dissolved 141 mg of the (ArgGlyAspThr) prepared in Practical Embodiment 1 (h) in 14.1 ml of 0.1 M boric acid buffer solution (pH 9.21). Then we added 1.96 g (3 eq. relative to amino group) of 3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid N-

hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 10000) and stirred it at room temperature for two hours. We adjusted the pH to 5.0 using 1 N hydrochloric acid and then filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m). Then we diluted it in distilled water so that the overall capacity was 100 ml. We refined this solution using reverse phase HPLC in the same way as in Practical Embodiment 1 (b) (however, the gradient conditions were as follows: (B) 0 % \rightarrow (60 minutes) 33 % \rightarrow (120 minutes) 39 %) and freeze-dried the desired fraction and obtained 495 mg of the compound indicated in the title.

[0039] Amino acid analytical values: Asx (5.03), Gly* (5.00), Arg (5.08), Thr (4.76).

***Standard amine acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions are the same as for Practical Embodiment 6

Retention time: 17.65 minutes

GPC

Analytical conditions are the same as for Practical Embodiment 6

Retention time: 26.00 minutes

[0040] Practical Embodiment 8

3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid modification

(ArgGlyAspThr)₃

We dissolved 200 mg of the (ArgGlyAspThr)₃ prepared in Practical Embodiment 4 (b) in 20 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21). Then, we added 4.59 g (3 eq. relative to amino group) of 3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 10000) and stirred this for 3 hours at room temperature. We adjusted this to pH 5.0 using 1 N hydrochloric acid and then filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m). We diluted this with distilled water so that the overall capacity was 160 ml. We refined this solution using reverse phase HPLC just as we did in Practical Embodiment 1 (h) (however, the gradient conditions were as follows : (B) 0 % \rightarrow (60 minutes) 30 % \rightarrow (120 minutes) 37 % \rightarrow (60 minutes) 40 % \rightarrow (60 minutes) 52 %), we freeze-dried the desired fraction and obtained 250 mg of the compound indicated in the title.

Amino acid analytical values: Asx (2.81), Gly* (3.00), Arg (2.88), Thr (2.72)

*** Standard amino acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 18.65 minutes

GPC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 26.28 minutes

[0041] Practical Embodiment 9

3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid modification

(ArgGlyAspThr)₇

We dissolved 192 mg of the (ArgGlyAspThr)₇ prepared in Practical Embodiment 3 (b) in 19.2 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21) and then added 2.54 g (4

eq. relative to amino group) of 3,4-bis-methoxy polyethylene glycol hydrocinnamic acid N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 10000) and stirred it for 2 hours at room temperature. We adjusted it to pH 5.0 using 1 N hydrochloric acid, filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m). We diluted it so that the overall capacity was 70 ml. We refined this solution using reverse phase HPLC just as in Practical Embodiment 1 (h) (however, the gradient conditions were as follows : (B) 0 % \rightarrow (60 minutes) 35 % \rightarrow (300 minutes) 45 %) and freeze-dried the desired fraction and obtained 188 mg of the compound indicated in the title.

Amino acid analytical values: Asx (7.01), Gly* (7.00), Arg (7.02), Thr (6.81)

*** Standard amino acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 17.21 minutes

GPC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 25.88 minutes

[0042] Practical Embodiment 10

Succinic acid monomethoxy polyethylene glycol modification (ArgGlyAspThr)₁₁

We dissolved 350 mg of the (ArgGlyAspThr)₁₁ prepared in Practical Embodiment 2 (f) in 35 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21). Then, we added 1.85 g (5 eq. relative to amino group) of succinic acid monomethoxy polyethylene glycol N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 5000) and stirred it for 2 hours at room temperature. We adjusted it to pH 5.0 using 1 N hydrochloric acid and then filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m). We diluted it with distilled water so that the overall capacity was 70 ml. We refined this solution using reverse phase HPLC just as we did in Practical Embodiment 3 (b) (however, the gradient conditions were as follows: (B) 0 % \rightarrow (60 minutes) 30 % \rightarrow (120 minutes) 36 % \rightarrow (120 minutes) 46 %), freeze-dried the desired fraction and obtained 495 mg of the compound indicated in the title.

Amino acid analytical values: Asx (10.2), Gly (11.0), Arg (10.3), Thr (10.1)

*** Standard amino acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment

Retention time: 12.83 minutes

GPC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 28.62 minutes

[0043] Practical Embodiment 11

Succinic acid monomethoxy polyethylene glycol modification (ArgGlyAsp Thr)₅

We dissolved 300 mg of the (Arg Gly Asp Thr)₅ prepared in Practical Embodiment 1 (h) in 30 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21). Then, we added 3.48 g (5 eq. relative to amino group) of succinic acid monomethoxy polyethylene glycol N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 5000) and

stirred it for two hours at room temperature. We adjusted it to pH 5.0 using 1 N hydrochloric acid and then filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m) and diluted it with distilled water so that the overall capacity was 100 ml. We refined this under the same conditions as in Practical Embodiment 10 using reverse phase HPLC, freeze-dried the desired fraction and obtained 581 mg of the compound indicated in the title. **Amino acid analytical values:** Asx (4.53), Gly* (5.00), Arg (4.51), Thr (4.62).

***Standard Amino acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 14.23 minutes

GPC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 29.28 minutes

[0044] Practical Embodiment 12

Succinic acid monomethoxy polyethylene glycol modification (Arg Gly Asp Thr)₃

We dissolved 120 mg of the (Arg Gly Asp Thr)₃ which we prepared in Practical Embodiment 4 (b) in 12 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21). Then we added 2.30 g (5 eq. relative to amino group) of succinic acid monomethoxy polyethylene glycol N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 5000) and stirred it for 3 hours at room temperature. We adjusted it to pH 5.0 using 1 N hydrochloric acid and then filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m). Then we diluted it with distilled water so that the overall capacity was 100 ml. We refined this using reverse phase HPLC (however, the gradient conditions were as follows: (B) 0 % \rightarrow (60 minutes) 35 % \rightarrow (120 minutes) 41 % (120 minutes) 51 %) just as we did in Practical Embodiment 3 (b), freeze-dried the desired fraction and obtained 236 mg of the compound indicated in the title.

Amino acid analytical values: Asx (2.88), Gly* (3.00), Arg (2.92), Thr (2.83)

***Standard amino acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 16.55 minutes

GPC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 29.58 minutes

[0045] Practical Embodiment 13

Succinic acid monomethoxy polyethylene glycol modification (Arg Gly Asp Thr)₇

We dissolved 169 mg of the (Arg Gly Asp Thr)₇ prepared in Practical Embodiment 3 (b) in 16.9 ml of a 0.1 M boric acid buffer solution (pH 8.21) and added 1.40 g (5 eq. relative to amino group) of the succinic acid monomethoxy ethylene glycol N-hydroxy succinimide ester (mean molecular weight of approximately 5000) and stirred it for 3 hours at room temperature. We adjusted it to pH 5.0 using 1 N hydrochloric acid and filtered out the insoluble matter using a membrane filter (0.45 μ m) and diluted it with distilled water so that the overall capacity was 100 ml. We refined this using reverse

phase HPLC just as we did in Practical Embodiment 3 (b) (however, the gradient conditions were as follows: (B) 0 % → (60 minutes) 30 % → (360 minutes) 42 % → (60 minutes) 48 %), freeze-dried the desired fraction and obtained 204 mg of the compound indicated in the title.

Amino acid analytical values: Asx (7.28), Gly* (7.00), Arg (7.09), Thr (6.72)

*** Standard amino acid**

Reverse phase HPLC

Analytical conditions were the same as for Practical Embodiment 6

Retention time: 13.92 minutes

GPC

Analytical conditions were the same as in Practical Embodiment 6

Retention time: 29.01 minutes

[0046] Practical Embodiment 14

Cancer Metastasis Inhibition Action of (Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n = 1,3,5, 7, 9,11) and poly (Arg-Gly-Asp-Thr)

We studied the cancer metastasis inhibition activity of (Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n=1,3,5,7,9,11) which has a distinct molecular weight as well as the poly (Arg-Gly-Asp-Thr) which is the RGDT polymer prepared using the same method as that indicated in [Japanese] Laid-Open Patent Specification H2-174798 and according to the method used by Saiki *et al.* ([Japanese] Laid-Open Patent Specification H2-174798). This means that we studied the cancer metastasis inhibition action of these compounds in B16-BL6 melanoma cells of mice using the peptide synthesized in Practical Embodiments 1,2,3,4 and 5 and poly(Arg-Gly-Asp-Thr). First, we mixed these compounds with B16-B16 melanoma cells (3×10^4 units; within 24 hour exponential growth period) as cancer cells with extremely strong metastasis characteristics of 500 μ g each in PBS. Then, we administered 2 ml to a group consisting of five C57BL/6 male mice by intravenous injection. We counted the number of cancer colonies in the lungs of the mice 14 days after administration and compared these with a group administered PBS as a control. Results are indicated in Table 1. According to these results, metastasis of cancer to the lungs was markedly inhibited by administration of (Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n = 3,5,7,9, 11) and by poly (Arg-Gly-Asp-Thr). In addition, the metastasis of cancer to the lungs was inhibited more potently by the (Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n = 5, 7, 9, 11) than the poly (Arg-Gly-Asp-Thr).

[0047]

[Table 1]

**Inhibition Action of Peptides Regarding Experimental Metastasis of
Cancer to Lungs Induced by Intravenous Injection to B16-LB16 Melanoma Cells**

| Compound administered | | Dose | Number of metastases to lungs 14 days later |
|-----------------------|-----|------------|--|
| | | (μ g) | Mean \pm SD (range) |
| PBS (unprocessed) | | | 46 \pm 6 (40 - 54) |
| (RDGT), | 500 | 36 | \pm 14 (22 - 52) |
| (RDGT), | 500 | 30 | \pm 10 (16 - 46) * |
| (RDGT), | 500 | 14 | \pm 4 (10 - 18) ** |
| (RDGT), | 500 | 12 | \pm 6 (6 - 22) * |
| (RDGT), | 500 | 16 | \pm 6 (8 - 20) ** |
| (RDGT) ₁₁ | 500 | 14 | \pm 6 (10 - 20) ** |
| poly (RDGT) | 500 | 26 | \pm 10 (14 - 40) * |

RGDT: Arg-Gly-Asp-Thr

* : P < 0. 05. ** : P < 0. 001

[0048] Practical Embodiment 15

Cancer Metastasis Inhibition Action of (Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁ and Polymer Modifier Thereof

We studied the cancer metastasis inhibition action of these compounds for the mouse B16-BL6 melanoma cells using the peptides synthesized in Practical Embodiments 2, 6 and 10 as well of the polymer modified peptide. First, we mixed 40,200 and 1000 μ g (amount of protein contained) of these compounds with respectively 3×10^4 B16-BL6 melanoma cells in PBS. Then we administered [the drug] to C57 BL/6 mice using the same method as in Practical Embodiment 15 and studied the cancer metastasis inhibition effect. Results are indicated in Table 2. As can be readily seen from the Table, the metastasis of cancer to the lungs was more potently inhibited by administering the polymer modifier than by administering the (Arg-gly-Asp-Thr)₁₁.

[0049]

[Table 2]

**Inhibition Action of Peptide and Polymer Modified Peptide
on Experimental Metastasis of Cancer to Lungs Induced
by Intravenous Injection of B16-B16 Melanoma**

| Compound administered | | Dose | Number of metastases to lungs 14 days later |
|-----------------------------|------|--------------|--|
| | | (μ g) | Mean \pm SD (range) |
| PBS (unprocessed) | | | 190 \pm 47 (48 - 85) |
| (RGDT) ₁₁ | 1000 | 10 \pm 5 | (0 - 14) |
| | 200 | 127 \pm 28 | (101 - 168) |
| | 40 | 156 \pm 34 | (126 - 194) |
| PEG2 - (RGDT) ₁₁ | 1000 | 0 | |
| | 200 | 50 \pm 12 | (38 - 64) |
| | 40 | 118 \pm 43 | (70 - 172) |
| PEG - (RGDT) ₁₁ | 1000 | 0 | |
| | 200 | 68 \pm 8 | (57 - 78) |
| | 40 | 125 \pm 11 | (125 - 140) |
| PEG2 | 3000 | 112 \pm 36 | (78 - 145) |

(RGDT)₁₁: : (Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁, synthesized in Practical Embodiment 2

PEG2 - (RGDT)₁₁: synthesized in Practical Embodiment 6

PEG - (RGDT)₁₁: synthesized in Practical Embodiment 10

*: P < 0.001

[Translator's note: the items appearing here have been moved to the first page for continuity.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-170796

(43)公開日 平成5年(1993)7月9日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|---------|----|--------|
| C 0 7 K 7/08 | ZNA | 8318-4H | | |
| A 6 1 K 37/02 | ADU | 8314-4C | | |
| C 0 7 K 7/10 | | 8318-4H | | |
| // C 0 7 K 99:00 | | | | |

審査請求 未請求 請求項の数24(全 13 頁)

| | | | |
|----------|------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願平3-355319 | (71)出願人 | 000183370 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 |
| (22)出願日 | 平成3年(1991)12月19日 | (72)発明者 | 東 市郎 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号 |
| | | (72)発明者 | ▲済▼木 育夫 北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目12-6 |
| | | (72)発明者 | 楠瀬 直人 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内 |

最終頁に続く

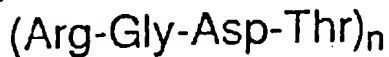
(54)【発明の名称】 細胞接着活性ペプチド及びその高分子修飾体

(57)【要約】

【構成】 細胞接着コア配列の繰り返し構造からなる、

式(1)

【化1】



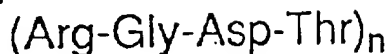
〔式中、nは3以上20以下の整数である。〕で表される高純度の細胞接着活性ペプチド。および、この細胞接着活性ペプチドのN末端アミノ基をポリエチレングリコール誘導体を用いて高分子修飾することによって得られる高分子修飾ペプチド。

【効果】 本発明の細胞接着活性ペプチドは、強い癌転移抑制活性を有し、その高分子修飾ペプチドはさらに強い癌転移抑制活性を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(1)

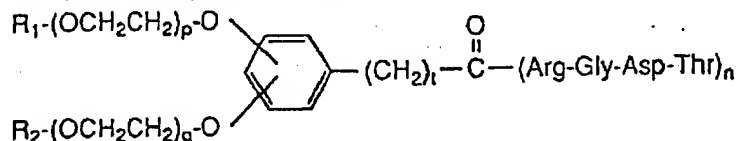
【化1】



【式中、nは3以上20以下の整数を表す。】で表され、高純度であることを特徴とするペプチドおよびその薬学的に許容される塩。

【請求項2】 HPLCによる純度が90%以上である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項3】 式(1)のnが3以上11以下の整数である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容さ*

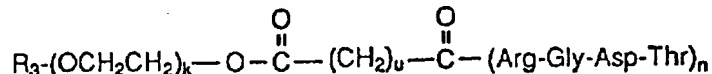


【式中、nは3以上20以下の整数を、R₁ およびR₂ は同一または異なる低級アルキル基を、pおよびqは各ポリエチレングリコール部分の平均分子量が約1000~12000となる同一または異なる任意の正の整数を、tは0または任意の正の整数を表す。】で表される高分子修飾ペプチドおよびその薬学的に許容される塩。

【請求項10】 式(11)のnが3以上11以下の整数である請求項9記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項11】 式(11)のnが3である請求項9記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項12】 式(11)のnが5である請求項9記※



【式中、R₃は低級アルキル基を、kはポリエチレングリコール部分の平均分子量が約1000~12000となる任意の正の整数を、nは3以上20以下の整数を、uは任意の正の整数を表す。】で表される高分子修飾ペプチドおよびその薬学的に許容される塩。

【請求項17】 式(111)のnが3以上11以下の整数である請求項16記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項18】 式(111)のnが3である請求項16記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項19】 式(111)のnが5である請求項16記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項20】 式(111)のnが7である請求項16記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容さ

*れる塩。

【請求項4】 式(1)のnが3である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項5】 式(1)のnが5である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項6】 式(1)のnが7である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項7】 式(1)のnが9である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項8】 式(1)のnが11である請求項1記載のペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項9】 式(11)

【化2】

※載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項13】 式(11)のnが7である請求項9記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項14】 式(11)のnが9である請求項9記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項15】 式(11)のnが11である請求項9記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項16】 式(111)

【化3】

れる塩。

【請求項21】 式(111)のnが9である請求項16記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項22】 式(111)のnが11である請求項16記載の高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項23】 請求項1から8記載のいずれかのペプチドまたはその薬学的に許容される塩を含む癌転移抑制剤。

【請求項24】 請求項9から22記載のいずれかの高分子修飾ペプチドまたはその薬学的に許容される塩を含む癌転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞接着活性ペプチ

ド、およびその高分子修飾体である、ポリエチレングリコール誘導体によって修飾された高分子修飾ペプチドに関する。さらに、これらペプチドまたは高分子修飾ペプチドを含む癌転移抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】フィブロネクチン、ラミニンおよびビトロネクチン等は、細胞と間質結合組織との接着に関与し、動物細胞の細胞機能に関連した多彩な生理活性を持つ蛋白質であり、細胞接着活性蛋白質と総称される。例えばフィブロネクチンは肝臓で合成されヒト血漿中に約0.3mg/mlの濃度で存在する糖蛋白質である。フィブロネクチンは、分子量約250KのポリペプチドA鎖と約240KのB鎖がカルボキシル末端近くでジスルフィド結合し、二量体を形成している。フィブロネクチンの一次構造は、コーンブリットら(Koornblit, A. R. et al: EMBO Journal, 4, 2519 (1985))により分子クローニング技術を用いて決定されている。また、ラミニンの一次構造は佐々木ら(Sasaki, M. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 935 (1987); Sasaki, M. et al: J. Biol. Chem., 262, 17111 (1987))により、そしてビトロネクチンは鈴木ら(Suzuki, S. et al: EMBO Journal, 4, 1755 (1985))によってそれぞれ決定されている。そして、細胞接着活性に関与する結合部位の研究も行われ、フィブロネクチンを蛋白質分解酵素で限定分解して得られる断片のヘパリン、コラーゲン、細胞および細菌への結合の研究から、それぞれA鎖、B鎖の両鎖とも結合部位が決定されている(Yamada, K. M.: Ann. Rev. Biochem., 52, 761 (1983))。さらに、その細胞結合部位のコア配列はArg-Gly-Asp(RGD)であることが1984年に解明された(Pierschbacher, M. D. et al: Nature, 309, 30 (1984))。このRGD配列は、ビトロネクチンなど他の接着性蛋白質にも存在していることが明らかになっている。

【0003】フィブロネクチンは上記コア配列を介して、被接着細胞のレセプターと接合し、その情報を接着細胞に伝達しており、また、ヘパリン、コラーゲン、フィブリン等の生体高分子との結合能を有し、細胞と間質結合組織との接着、細胞の分化、増殖に関与していると考えられている(Yamada, K. M.: Ann. Rev. Biochem., 52, 961 (1983))。このように、細胞接着活性蛋白質は、種々の生物活性を有するため、医薬等への応用が研究されている。例えば、血漿中のフィブロネクチン量が低下すると網内皮系の機能が低下する。このような場合としては、外科手術や外傷による敗血症、播種性血管内血液凝固、

火傷、重症感染症や外科的ショック等が挙げられる。これらの症状の改善のために、フィブロネクチンの投与が有効であると考えられている。また、フィブロネクチンは繊維芽細胞やマクロファージの遊走能を刺激することから、創傷の治癒や免疫能の機能の調整への応用が考えられている。とくに創傷の治癒促進効果を利用した角膜障害への局所治療は、既に試みられている(Fujikawa, L. S. et al: Lab. Invest., 45, 120 (1981))。

【0004】更に、細胞接着活性蛋白質は、癌転移に係る物質としても注目されている。癌転移の一連の段階では、癌細胞は種々の宿主細胞や生体高分子と接触する。この時、フィブロネクチンやラミニンのような細胞接着分子が存在すると、該細胞は多細胞塊を形成し、癌細胞の増殖や生存をより容易にする。事実、ラミニンを癌細胞と混合して動物に投与すると、癌転移が増強することが認められている。ところが、ラミニン由来のプロテアーゼ分解フラグメントは、逆に癌転移阻害活性を有することが報告されている(Barsky, S. H. et al: J. Clin. Invest., 74, 843 (1984))。同様に、フィブロネクチンの接着コアであるトリペプチドArg-Gly-Asp(Humphries, M. J. et al: Science, 233, 467 (1986))やラミニンの接着コアであるペンタペプチドTyr-Ile-Gly-Ser-Arg(Iwamoto, Y. et al: Science, 238, 1132 (1987))も癌の転移を抑制することが確認されている。さらに、これら接着コアの繰り返し構造からなるポリマーペプチドは、そのモノマーペプチドに比べ強い血小板凝集抑制活性および癌転移抑制活性を示すことが知られている。(東等、特開平2-174798号公報)

【0005】一方、ペプチド性医薬品を生体内に投与する際の問題点として、生体内クリアランスが非常に速いという点と、ヒト型の天然蛋白質以外には抗原性があるという点が挙げられる。このような問題点を解決するための有用な手段のひとつとして、ポリエチレングリコール誘導体によってタンパク質、ペプチドを修飾することにより、生体内クリアランスを遅延させたり、抗原性を低下させることが知られている。(Jpn. J. Cancer Res., 77, 1264 (1986))。特公昭56-23587号公報、特開昭61-178926号公報、Cancer Biochem. Biophys., 7, 175 (1984)、特開昭62-115280号公報など。)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、フィブロネクチンやラミニン等の細胞接着活性蛋白質は、様々な生物活性を有しており、その関連物質を医薬として応用する技術の開発が望まれていた。特に、フィブロネク

チンやラミニン等の接着コア配列の癌転移抑制作用は、医薬としての応用価値の高いものと考えられるが、該コア配列の細胞接着活性が充分でないため、それらの癌転移抑制作用は実際の医療に应用するためには充分満足できるものではなく、この点で更に高い活性を持つ物質の開発が望まれていた。しかしながら、細胞接着活性蛋白質は天然物質であるからその供給に制限があり、しかも糖蛋白質であるから、合成法や遺伝子工学的に効率良く生産するのも非常に困難である。上述の問題点を解決する為に、先に述べたように細胞接着コア配列の繰り返し構造を有するArg-Gly-Aspのポリマー、Arg-Gly-Asp-Serのポリマー、およびArg-Gly-Asp-Thrのポリマーにすることにより、細胞接着活性が上昇することが知られている（特開平2-174798号公報, Jpn. J. Cancer Res., 81, 660 (1990) , Cancer Res., 49, 3815 (1989) , Int. J. Biol. Macromol., 11, 226 (1989)）。上記文献のいずれの場合においても、ポリマーペプチドの製造は対応するモノマーペプチドをジフェニルホスホリルアジド (DPPA) による連続的重合法で重合化させて製造する方法である。しかしながら、上記文献に記載の方法によってArg-Gly-Asp-Thrのポリマーの合成を試みたところ、逆相高速液体クロマトグラフィーによる分析の結果、反応生成物は極めて多種類のポリマーおよびポリマー合成時の副生成物であると予想される多種類の化合物からなる混合物であることが判明した。

【0007】すなわち、従来知られている方法ではポリマーペプチドを得るための重合度をコントロールすることは極めて難しく、事実上均一なポリマーペプチドのみを得るのは極めて困難であることが判明した。加えて、本製造法では一定の品質の化合物を得ることが難しいと予想され、医薬品化を考慮した場合、大きな問題になると思われる。また、このような広範囲にわたる分子量を持つ種々の化合物を含むペプチド混合物から、工業的な*

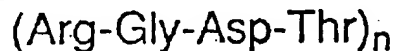
*分離、精製手段（再結晶、再沈澱、限外濾過など）によって細胞接着コア配列繰り返し構造を持つ分子量の明確なペプチドを得ることは、従来なし得られていないのが実状である。さらに、このような広範囲にわたる分子量を持つ種々の化合物を含むペプチド混合物を原料として、さらに誘導化（例えば、高分子修飾試剤による修飾など）をする場合には、得られる誘導体においても同様の問題が生じることは明らかであり、このようなペプチド混合物は誘導化の原料としては不適当である。従って、本発明の目的のひとつは、細胞接着活性蛋白質の接着コアアミノ酸配列の繰り返し構造からなる均一で高純度のポリペプチドを提供することである。また、前述したように接着コアアミノ酸配列を繰り返し構造にすることにより、高活性になることが知られているが、医薬品として使用するためには、さらに活性の強い化合物が望まれている。そこで、本発明のもう1つの目的は更により生物活性の強い化合物を得るために、上記の高純度のポリペプチドにポリエチレングリコール誘導体を縮合させることによって得られる修飾ポリペプチドを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、式(1)の高純度の細胞接着活性ペプチド（ペプチド(1)）を得ることができた。また、ポリエチレングリコールを用いて高分子修飾体を製造することにより、高活性化に導くことができ、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

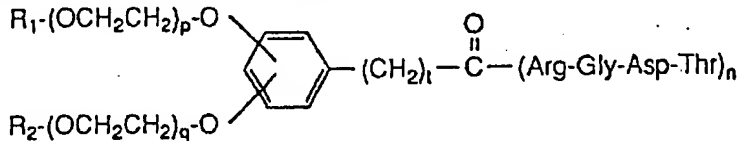
【0009】本発明は、(1)式(1)

【化4】



【式中、nは3以上20以下の整数を表す。】で表され、高純度であることを特徴とするペプチド（ペプチド(1)）、(2)式(11)

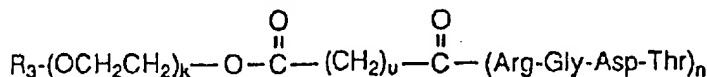
【化5】



【式中、nは3以上20以下の整数を、R₁ および R₂ は同一または異なる低級アルキル基を、p および q は各ポリエチレングリコール部分の平均分子量が約1000~12000となる同一または異なる任意の正の整数 ※

※を、tは0または任意の正の整数を表す。】で表される高分子修飾ペプチド（修飾ペプチド(11)）、(3)式(111)

【化6】



【式中、R₃ は低級アルキル基を、kはポリエチレングリコール部分の平均分子量が約1000~12000と

なる任意の正の整数を、 n は3以上20以下の整数を、 u は任意の正の整数を表す。)で表される高分子修飾ペプチド(修飾ペプチド(III))、(4)ペプチド(I)を含む癌転移抑制剤、および(5)修飾ペプチド(II)または(III)を含む癌転移抑制剤を提供するものである。

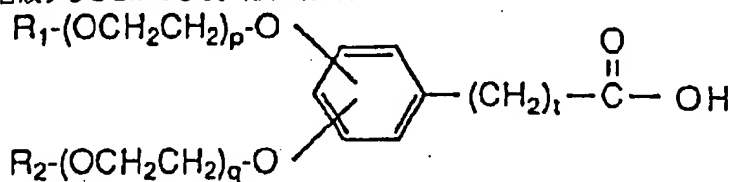
【0010】上記式中、 n で示される正の整数としては、3ないし11が好ましく、 R_1 、 R_2 、および R_3 で表される低級アルキル基は、直鎖状、分枝状のいずれでもよいが、メチル、エチル、イソプロピル、 n -ブチル等の炭素数1~4の低級アルキル基が好ましい。また、ポリエチレングリコール部分の平均分子量としては3000ないし7000が好ましく、 t で表される整数としては1ないし10が好ましく、 u で表される正の整数としては1ないし10が好ましい。本発明のペプチドおよび高分子修飾ペプチドには、L-型アミノ酸およびD-型アミノ酸からなるもの、いずれも含まれる。特に、L-型アミノ酸が好ましい。また、本発明の化合物は医薬品として用いるために、薬学的に許容する塩、例えば塩酸塩、硫酸塩等の無機酸との塩や、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の有機酸との塩にしてもよく、そのような塩への変換は、慣用手段で行うことができる。

【0011】本発明のペプチド(I)は目的とする化合物の純度を高めるため、Arg-Gly-Asp-Thrのモノマーを重合させる方法とは異なり、合成の各段階において中間体の1次配列をはっきりしている方法で、目的物の1次配列を構築する方法にて合成することができる。このような方法としては、化学的合成法および遺伝子工学的手法を用いた合成法が知られているが、いずれの方法にて合成することができる。化学的合成*

*法においては、液相法、固相法が知られているが、いずれの方法にて合成可能である。また、目的とする1次配列をN末端またはC末端より順次構築するステップワイズ延長法、目的とする1次配列を適当なフラグメントに分け、それらフラグメントを縮合させて目的物を構築するフラグメント縮合法が知られているが、いずれの方法またはそれらを組み合わせることにより、合成することができる。また、必要に応じては、官能基(アミノ基、カルボキシル基、グアニジノ基、水酸基)を保護しても良い。縮合法、保護基、反応条件等については、「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善株式会社)、「生化学実験講座・第一巻 蛋白質の化学IV」(東京化学同人)などに記載の通常のペプチド合成に用いられる方法、保護基、反応条件を用いて合成することができる。また、必要に応じては、逆相HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの通常のペプチドの精製法に従って、精製しても良い。こうして得られる細胞接着活性ペプチドの純度は、HPLCの面積百分率90%以上であり、好ましくは95%以上である。本発明の細胞接着活性ペプチドは、Arg-Gly-Asp-Thrのモノマーを重合させる方法で製造した分子量の明確でない複数の成分からなるポリマーに比べ、効果的に癌転移を抑制する。くわえて、本発明の細胞接着活性ペプチドは、高純度であるために医薬品としてより生物活性の強い化合物を得るための誘導化(たとえば高分子修飾試剤による修飾など)の原料ペプチドとして極めて有用である。

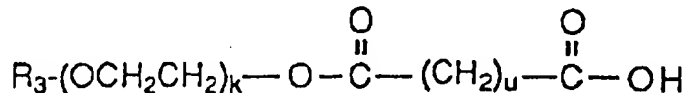
【0012】本発明の修飾ペプチド(II)または(III)の製造は、それぞれ、式(IV)

【化7】



【式中、 R_1 、 R_2 、 p 、 q 、 t は式(III)と同意義を有する。】で表されるポリエチレングリコール誘導体※40 ※(IV)、または式(V)

【化8】



【式中、 R_3 、 k および u は、式(III)と同意義を有する。】で表されるポリエチレングリコール誘導体(V)のカルボキシル基活性化体とアミノ基を有するペプチド(I)とを反応させることによって行われる。ポリエチレングリコール誘導体(II)または(V)の活性化方法は通常カルボキシル基の活性化法、例えば生

化学実験講座第一巻、タンパク質の化学IV(東京化学同人)、ペプチド合成の基礎と実験(泉屋ら、丸善株式会社)に記載されているカルボキシル基の活性化方法より活性化することができる。ポリエチレングリコール誘導体(II)または(V)のカルボキシル基活性化体と、ペプチド(I)との反応においては、反応の温度は

当該ペプチド(1)が失活しない温度であればいずれでも良く、例えば0~25℃の範囲が好ましい。本発明において用いられるポリエチレングリコール誘導体(11)または(V)は、pH4.5以上のいずれのpHでも反応させることができるので、反応のpHは当該ペプチドが失活しないpH4.5以上のpHであればいずれでも良いが、6~9の範囲が好ましい。

【0013】反応に用いる溶媒は、反応を妨害しないものであればいずれでもよく、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸ナトリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、N-エチルモルホリン-酢酸緩衝液、マレイン酸ナトリウム緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等の緩衝液が挙げられる。また、当該ペプチドを失活させず、かつ反応に不活性な有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、プロパノール等の低級アルコールやアセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等を添加してもよい。反応時間は1~72時間で充分である。反応終了後に、反応液を塩析やゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、限外濾過、逆相HPLCなどの通常の蛋白質の精製法で精製して目的の修飾ペプチドを得ることができる。

【0014】本発明の高純度のペプチド(1)は細胞接着活性蛋白質のコア配列を繰り返して有し、該コア配列を介して細胞接着活性蛋白質と同様の機序で細胞に接着すると考えられる。そのため細胞接着活性蛋白質のアゴニストまたはアンタゴニストとして、種々の生物活性を示す。特に、細胞接着活性蛋白質のコア配列に比べて本発明のペプチド(1)は、数倍強い癌転移抑制作用を有する。その他にも毛細血管中で起こる癌細胞による血小板凝集の抑制作用などの生物活性が認められている。さらに、ポリエチレングリコール誘導体(11)および(V)で修飾されたペプチド(1)は、対応する非修飾ペプチド(1)と比較すると非常に安定な化合物であり、かつ非修飾ペプチド(1)に比べ強力な癌転移抑制活性を有する。即ちポリエチレングリコール修飾ペプチドは、さらに生体内クリアランスも著しく遅延(即ち持続性が延長)され、長時間有効にその生理活性を示す。しかも、本発明の修飾ペプチドは非修飾ペプチド(1)の有する生理活性をそのまま有するものである。本発明のペプチドおよび高分子修飾ペプチドは医薬品、動物薬として極めて有効である。本発明のペプチドおよび高分子修飾ペプチドは、通常それ自体公知の担体、希釈剤などを用い、適宜の医薬品組成物よりなる製剤(例えば、カプセル剤、注射剤など)として経口的または非経口的に哺乳動物(例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヒトなど)に投与される。癌転移抑制剤として投与する場合*

*には、本発明のペプチドおよび高分子修飾ペプチドは、0.2μg/kg~400mg/kgの範囲で、症状、年齢、体重等に基づいて決定され、1日1回から数回に分けて投与することができる。

【0015】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。なお、以下の実施例において、ペプチドまたは高分子修飾ペプチドのアミノ酸分析値とは、これらペプチドまたは高分子修飾ペプチドの酸分解物(6N塩酸-フェノール, 110℃, 24時間処理後の分解物)中のアミノ酸分析値を表す。略号は以下の通りである。

Boc : ベンジルオキシカルボニル

cHex : シクロヘキシル

Bzl : ベンジル

Tos : p-トルエンスルホン

Pac : フェナシル

【0016】実施例1

(Arg-Gly-Asp-Thr), の調製

a) Boc-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly) : -OPac
Boc-Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly-OPac 17.24g (0.017mol) をアセトニトリル70mlに溶解し、氷冷下メタンスルホン酸13.38g (0.139mol) を滴下したのち、室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、DMF 70mlを滴下し、さらにトリエチルアミン12.3g (0.020mol) を滴下した。つづいて、Boc-Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly-OH 16.0g (0.018mol), 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(以下HOBtと省略) 2.72g (0.020mol), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(以下WSCと省略) 3.12g (0.020mol) を氷冷下で加え、30分攪拌したのち、室温で3時間攪拌した。反応液を1%食塩水2l中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈殿物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物30.2gを得た。

【0017】

b) Boc-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly) : -OH
実施例1(a)の化合物30.80g (0.018mol) を90%酢酸200mlに溶解し、氷冷下亜鉛末57.2g (0.883mol) を3回に分けて5分ごとに加え、室温に戻して激しく攪拌した。3時間後、反応液をセライト濾過し、濾液を1%食塩水2.2l中に注ぎ、氷冷下で攪拌したのち沈殿物を濾取し、水洗後、エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物27.1gを得た。

【0018】

c) Boc-Arg(Tos)Gly-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly) : -OPac

実施例1(a)の化合物15.75g (9.0mmol) をアセトニトリル150mlに溶解し、氷冷下、メタ 50
ンスルホン酸13.82g (0.144mol) を滴下したのち、室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、DMF

150mlを滴下し、さらにトリエチルアミン13.6g (0.135mol)を滴下した。つづいて、Boc-Arq(Tos)Gly-OH 4.78g (0.010mol), HO Bt 1.47g (0.011mol), WSC 1.69g (0.011mol)を氷冷下に加え、30分間攪拌

d) Boc-Arq(Tos)Gly-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arq(Tos)Gly), -OH

実施例1(c)の化合物17.52g (8.3mmol)を90%酢酸水450mlに溶解し、氷冷下亜鉛末27.0g (0.415mol)を3回に分けて5分ごとに加え、室温に戻して激しく攪拌した。1時間後、反応液※10

e) Boc-Arq(Tos)Gly-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arq(Tos)Gly), -OH

実施例1(a)の化合物13.79g (7.9mmol)をアセトニトリル100mlに溶解し、氷冷下、メタンスルホン酸15.17g (0.158mol)を滴下したのち室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、DMF 20ml、つづいてトリエチルアミン15.16g (0.150mol)を滴下した。つづいて実施例1(d)の化合物16.5g (8.3mmol)、HOBt 1.23g

f) Boc-Arq(Tos)Gly-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arq(Tos)Gly), -OH

実施例1(e)の化合物28.97g (8mmol)を90%酢酸水1.3lとトリフルオロエタノール250mlの混合溶媒に溶解し、室温で亜鉛末104g (1.6mol)を3回に分けて、5分ごとに加え、45℃に加熱して2時間激しく攪拌した。セライト濾過し、濾液を1%食塩水2.5l中に滴下し、氷冷下で攪拌したのち沈澱物を濾取し水洗後エーテルで洗浄、乾燥して、表題化合物22.2gを得た。

[0022]

g) Boc-(Arq(Tos)GlyAsp(OcHex)Thr(Bzl)), -OBzl
Boc-Asp(OcHex)Thr(Bzl)-OBzl 1.91g (3.2mmol)をアセトニトリル100mlに溶解し、氷冷下メタンスルホン酸2.46g (22.4mmol)を滴下したのち、室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、DMF 225ml、N-メチル-2-ピロリジノン 25mlを滴下し、さらにトリエチルアミン 1.94g (19.2mmol)を滴下した。つづいて、実施例1(f)の化合物 12.0g (3.4mmol)、HOBt 0.55g (4.0mmol)、WSC 0.64g (4.0mmol)を氷冷下に加え、30分間攪拌したのち、室温で3時間攪拌した。反応液を1%食塩水2l中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後沈澱物を濾取し水洗後エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物12.4gを得た。

[0023]

h) (Arg-Gly-Asp-Thr),
実施例1(g)の化合物6.0gをアニソール25ml、メチルエチルスルフィド7mlの存在下無水フッ化水素160mlを減圧下、-78℃に加え、-20℃で1.5時間、0℃で22時間処理した。フッ化水素を減圧下0℃

a) Boc-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arq(Tos)Gly), -Asp(OcHex)Thr(Bzl)-OBzl

Boc-Asp(OcHex)Thr(Bzl)-OBzl 2.39g (4.0mmol)をアセトニトリル30mlに溶解し、氷冷下メタン

※拌したのち、室温で3.5時間攪拌した。反応液を1%食塩水2.5l中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して、表題化合物18.0gを得た。

[0019]

※をセライト濾過し、濾液を1%食塩水2.5l中に注ぎ、氷冷下で攪拌したのち沈澱物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して、表題化合物18.7gを得た。

[0020]

★g (9.1mmol)、WSC 1.41g (9.1mmol)を氷冷下に加え、30分間攪拌したのち室温で1.5時間攪拌した。反応液を1%食塩水2.5l中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して、表題化合物29.2gを得た。

[0021]

20☆℃で除去し、残渣をエーテルでトリチュレートした。得られた固体を、5%酢酸水に溶解し、不溶物を濾去後、濾液を凍結乾燥し、表題化合物の粗生成品 3.70g得た。この粗生成品 3.70gを逆相HPLC (カラム: YMC-ODS 50mmφ×500mm, 15~30μ; 流速: 15ml/min; 検出波長: 220nm; 溶出液: (A) 水-0.1%トリフルオロ酢酸 (B) アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸; グラジェント: (B) 0%→(180分) 6%→(240分) 10%)によって精製して、表題化合物 870mgを得た (HPLC面積百分率97.2%)。

MS (FAB) m/e 2166 (M+H⁺)

アミノ酸分析値: Asx (4.83), Gly⁺ (5.00), Arg (4.79), Thr (4.75) [Gly⁺を基準として算出]

逆相HPLC

カラム: YMC-ODS, 5μ

4.6mmφ×250mm

溶出液: グラジェント

A液: 水-0.1%トリフルオロ酢酸

B液: アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸

初期B液濃度: 7%

濃度勾配: 0.5%/分

流速: 1ml/分

検出波長: 220nm

保持時間: 12.55分

[0024] 実施例2

(Arg-Gly-Asp-Thr)₂の調製

スルホン酸 3.08 g (32 mmol) を滴下したのち、室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、DMF 50 ml を滴下し、さらにトリエチルアミン 2.83 g (28 mmol) を滴下した。つづいて、実施例1 (b) の化合物 6.85 g (4.2 mmol)、HOBt 654 mg (4.8 mmol)、WSC 751 mg (4.8 mmol)*

b) Boc-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly) -Asp(OcHex)Thr(Bzl)-OBzl

実施例2 (a) の化合物 7.95 g (3.8 mmol) をアセトニトリル 70 ml に懸濁し、氷冷下メタンスルホン酸 5.80 g (60.3 mmol) を滴下したのち、室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、DMF 120 ml を滴下し、さらにトリエチルアミン 5.72 g (56.6 mmol) を滴下した。つづいて実施例1 (b) の化合物 6.45 g (4.0 mmol)、HOBt*

c) Boc-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly) -Asp(OcHex)Thr(Bzl)-OBzl

実施例2 (b) の化合物 13.0 g (9.0 mmol) をアセトニトリル 70 ml に懸濁させ、氷冷下メタンスルホン酸 7.25 g (111 mmol) を滴下したのち、室温で1時間攪拌した。再び氷冷し、N-メチル-2-ピロリジノン 100 ml を滴下し、さらにトリエチルアミン 10.9 g (108 mmol) を滴下した。つづいて実施例1 (b) の化合物 6.15 g (3.8 mmol)*

d) H-(Asp(OcHex)Thr(Bzl)Arg(Tos)Gly) -Asp(OcHex)Thr(Bzl)-OBzl

実施例2 (c) の化合物 16.0 g (3.1 mmol) をトリフルオロ酢酸 130 ml に溶解し、氷冷下で3.5時間攪拌した。反応液を、氷冷したエーテル 1 l に注ぎ、30分間攪拌して沈澱物を濾取した。この沈澱物を、DMF 300 ml にとかしトリエチルアミン 3.16 g (31 mmol) を氷冷下で滴下したのち、30分間攪拌した。反応液を1%食塩水 1.5 l 中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取、水洗し、エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 15.0 g を得た。【0028】

e) Boc-(Arg(Tos)GlyAsp(OcHex)Thr(Bzl))₁₁-OBzl

実施例1 (f) の化合物 10.4 g (2.96 mmol) と実施例2 (d) の化合物 14.90 g (2.96 mmol) を、DMF 200 ml と、N-メチルピロリジノン 200 ml の混合溶媒に溶解し 5~10℃で HOBt 485 mg (3.59 mmol)、WSC·HCl 690 mg (3.59 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を、1%食塩水 3 l 中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 22.6 g を得た。【0029】

f) (Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁

実施例2 (e) の化合物 7.50 g をアニソール 12 ml、メチルエチルスルフィド 2 ml の存在下無水フッ化水素 80 ml を減圧下、-78℃で加え、実施例1 (f) と同様の処理を行い、表題化合物の粗生成物 4.50 g を得た。この粗生成物 4.50 g を逆相HPLC

※ o l) を氷冷下で加え、30分間攪拌したのち、室温で3時間攪拌した。反応液を1%食塩水 700 ml 中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取、水洗し、エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 7.95 g を得た。【0025】

※ t 616 mg (4.6 mmol)、WSC 708 mg (4.6 mmol) を加え、30分間攪拌後、室温で3.5時間攪拌した。反応液を1%食塩水 1600 ml 中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取、水洗し、エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 13.1 g を得た。【0026】

★ mol), HOBt 587 mg (4.3 mmol)、WSC 675 mg (4.3 mmol) を加え、30分間攪拌後、室温で4時間攪拌した。反応液を1%食塩水 1.6 l 中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取、水洗し、エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 16.3 g を得た。【0027】

PLC (カラム: YMC-ODS 50 mmφ×500 mm, 15~30 μ; 流速: 15 ml/min; 検出波長: 220 nm; 溶出液: (A) 水-0.1%トリフルオロ酢酸 (B) アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸; グラジェント: (B) 0%→(180分) 8%→(180分) 17%) によって精製して、表題化合物 1.03 g を得た (HPLC 面積百分率 96.9%)。MS (FAB) m/e 4743 (M+H⁺) アミノ酸分析値: Asx (11.1), Gly* (11.0), Arg (11.3), Thr (11.1) [Gly* を基準として算出]

逆相HPLC

分析条件は実施例1と同じ

保持時間 : 17.56分

【0030】

実施例3

(Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁ の調製

a) Boc-(Arg(Tos)GlyAsp(OcHex)Thr(Bzl))₁₁-OBzl

実施例2 (d) の化合物 1.22 g (0.24 mmol)、Boc-Arg(Tos)Gly-OH 129 mg (0.27 mmol) を DMF 5 ml と、N-メチル-2-ピロリジノン 25 ml の混合溶媒に溶解し、5~10℃で HOBt 39 mg (0.29 mmol)、WSC·HCl 56 mg (0.29 mmol) を加え、30分間攪拌後、室温で4.5時間攪拌した。反応液を1%食塩水 300 ml 中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 1.23 g を得た。

得た。

【0031】

b) (Arg-Gly-Asp-Thr),
実施例3(a)の化合物1.23gを、アニソール 6 ml, メチルエチルスルフィド 1.5 mlの存在下、無水フッ化水素 40 mlを減圧下、-78℃で加え、実施例1(f)と同様の処理を行い、表題化合物の粗生成物 728 mgを得た。この粗生成物 728 mgを逆相HPLC (カラム: YMC-ODS 30 mmφ×250 mm, 15~30 μ; 流速: 7 ml/min; 検出波長: 220 nm; 溶出液: (A) 水-0.1%トリフルオロ酢酸 (B) アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸; グラジェント: (B) 0%→(180分) 7%→(60分) 10%→(120分) 14%) によって精製して、表題化合物 191 mgを得た (HPLC面積百分率 95.9%)。

MS (FAB) m/e 3025 (M+H⁺)

アミノ酸分析値: Asx (7.17), Gly^{*} (7.00), Arg (7.11), Thr (7.10) [Gly^{*}を基準として算出]

逆相HPLC

分析条件は実施例1と同じ

保持時間 : 14.92分

【0032】

実施例4

(Arg-Gly-Asp-Thr), の調製

a) Boc-(Arg(Tos)GlyAsp(OcHex)Thr(Bzl)), -OBzl
実施例2(a)の化合物1.80g (0.85 mmol) をアセトニトリル15 mlに懸濁し、氷冷下メタンスルホン酸 1.23g (12.8 mmol) を滴下したのち、室温で3.5時間攪拌した。再び氷冷し、DMF 10 mlを滴下し、さらにトリエチルアミン1.21g (21 mmol) を滴下した。つづいてBoc-Arg(Tos)Gly-OH 433 mg (0.90 mmol), HOBt 138 mg (1.02 mmol), WSC 159 mg (1.02 mmol) を加え、30分間攪拌後、室温で3時間攪拌した。反応液を1%食塩水 300 ml中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取、水洗しエーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 2.03 gを得た。

【0033】

b) (Arg-Gly-Asp-Thr),
実施例4(a)の化合物1.80gを、アニソール 6 ml, メチルエチルスルフィド 1.5 mlの存在下、無水フッ化水素 40 mlを減圧下、-78℃で加え、実施例1(f)と同様の処理を行い、粗生成物 1.00 gを得た。この粗生成物 1.00 gを実施例3(b)と同じ逆相HPLCを用いて精製 (グラジェント条件のみ実施例3(b)と異なり、(B) 0%→(180分) 11%→(120分) 15%) を2回繰り返して行い、表題化合物 143 mgを得た (HPLC面積百分率 97.4

%)。

MS (SIMS) m/e 1306 (M+H⁺)

アミノ酸分析値: Asx (3.03), Gly^{*} (3.00), Arg (2.99), Thr (3.03) [Gly^{*}を基準として算出]

逆相HPLC

分析条件は実施例1と同じ

保持時間 : 7.75分

【0034】実施例5

(Arg-Gly-Asp-Thr), の調製

a) Boc-(Arg(Tos)GlyAsp(OcHex)Thr(Bzl)), -OBzl
実施例1(d)の化合物629 mg (0.32 mmol) と、実施例2(d)の化合物1.51g (0.30 mmol) をDMF 40 mlに溶解し、氷冷下、HOBt 49 mg (0.36 mmol), WSC·HCl 69 mg (0.36 mmol) を加え、室温で4時間反応した。反応液を、1%食塩水 300 ml中に注ぎ、氷冷下で30分間攪拌後、沈澱物を濾取し、水洗後エーテルで洗浄、乾燥して表題化合物 1.83 gを得た。

20 【0035】b) (Arg-Gly-Asp-Thr)

実施例5(a)の化合物1.50gを、アニソール 6 ml, メチルエチルスルフィド 1.5 mlの存在下、無水フッ化水素 40 mlを減圧下、-78℃で加え、実施例1(f)と同様の処理を行い、粗生成物 940 mgを得た。この粗生成物440 mgを実施例3(b)と同じ逆相HPLCを用いて精製 (グラジェント条件のみ実施例3(b)と異なり、(B) 0%→(180分) 8%→(180分) 17%) を行い、表題化合物 74 mgを得た (HPLC面積百分率 100%)。

MS (FAB) m/e 3884 (M+H⁺)

アミノ酸分析値: Asx (9.24), Gly^{*} (9.00), Arg (9.32), Thr (9.39) [Gly^{*}を基準として算出]

逆相HPLC

分析条件は実施例1と同じ

保持時間 : 16.06分

【0036】実施例6

3, 4-ビス-メトキシポリエチレングリコール ハイ
ドロ桂皮酸修飾 (ArgGlyAspThr)₁₁
実施例2(f)で調製した (ArgGlyAspThr)₁₁ 300 mgを、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH 8.21) 30 mlに溶解させた後、3, 4-ビス-メトキシポリエチレングリコール ハイドロ桂皮酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (平均分子量約10000) 2.53g (アミノ基に対して4 eq.) を加え、室温で2時間攪拌した。1N塩酸でpH 5.0に調製したのちメンブランフィルター (0.45 μm) で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を150 mlとして、この溶液を実施例1(h)で使用したのと同じ逆相HPLCを用いて精

製(但し、グラジェント条件は次のとおり。:(B)0%→(60分)30%→(180分)35%→(120分)40%→(60分)45%)を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 495mgを得た。

【0037】アミノ酸分析値:Asx(11.0), Gly⁺(11.0), Arg(10.8), Thr(10.3)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

カラム:YMC-ODS, 5μ

4.6mmφ×250mm

溶出液:グラジェント

A液:水-0.1%トリフルオロ酢酸

B液:アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸

初期B液濃度:30%

濃度勾配:1%/分

流速:1ml/分

検出波長:10nm

保持時間:16.35分

GPC

カラム:TSK gel G3000SW

7.5mmφ×600mm(東ソー社製)

溶出液:0.2M食塩水(5%エタノール含有)

流速:0.6ml/分

検出波長:10nm

保持時間:25.63分

【0038】実施例7

3,4-ビス-メトキシポリエチレングリコール-ハイドロ桂皮酸修飾(ArgGlyAspThr),

実施例1(h)で調製した(ArgGlyAspThr), 141mgを、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.21)14.1mlに溶解させた後、3,4-ビス-メトキシポリエチレングリコール-ハイドロ桂皮酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(平均分子量約10000) 1.96g(アミノ基に対して3eq.)を加え、室温で2時間攪拌した。1N塩酸でpH5.0に調製したのち、メンブランフィルター(0.45μm)で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を100mlとした。この溶液を実施例1(h)で使用したのと同じ逆相HPLCを用いて精製(但し、グラジェント条件は次のとおり。:(B)0%→(60分)33%→(120分)39%)を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物495mgを得た。

【0039】アミノ酸分析値:Asx(5.03), Gly⁺(5.00), Arg(5.08), Thr(4.76)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間:17.65分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間:26.00分

【0040】実施例8

3,4-ビス-メトキシポリエチレングリコール-ハイドロ桂皮酸修飾(ArgGlyAspThr),

実施例4(h)で調製した(ArgGlyAspThr), 200mgを、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.21)20mlに溶解させた後、3,4-ビス-メトキシポリエチレングリコール-ハイドロ桂皮酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(平均分子量約10000) 4.59g(アミノ基に対して3eq.)を加え、室温で3時間攪拌した。1N塩酸でpH5.0に調製したのちメンブランフィルター(0.45μm)で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を160mlとした。この溶液を実施例1(h)で使用したのと同じ逆相HPLCを用いて精製(但し、グラジェント条件は次のとおり。:(B)0%→(60分)30%→(120分)37%→(60分)40%→(60分)52%)を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 250mgを得た。

アミノ酸分析値:Asx(2.81), Gly⁺(3.00), Arg(2.88), Thr(2.72)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間:18.65分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間:26.28分

【0041】実施例9

3,4-ビス-メトキシポリエチレングリコール-ハイドロ桂皮酸修飾(ArgGlyAspThr),

実施例3(b)で調製した(ArgGlyAspThr), 192mgを、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.21)19.2mlに溶解させた後、3,4-ビス-メトキシポリエチレングリコール-ハイドロ桂皮酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(平均分子量約10000) 2.54g(アミノ基に対して4eq.)を加え、室温で2時間攪拌した。1N塩酸でpH5.0に調製したのち、メンブランフィルター(0.45μm)で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を70mlとした。この溶液を実施例1(h)で使用したのと同じ逆相HPLCを用いて精製(但し、グラジェント条件は次のとおり。:(B)0%→(60分)35%→(300分)45%)を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 188mgを得た。

アミノ酸分析値:Asx(7.01), Gly⁺(7.00), Arg(7.02), Thr(6.81)

*基準アミノ酸

50 逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 17.21分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 25.88分

【0042】実施例10

コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール修飾 (Arg Gly Asp Thr), 11

実施例2(f)で調製した (Arg Gly Asp Thr), 350mgを、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH 8.21) 35mlに溶解させた後、コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (平均分子量約5000) 1.85g (アミノ基に対して5eq.)を加え、室温で2時間攪拌した。1N塩酸でpH 5.0に調製したのち、メンブランフィルター (0.45μm) で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を70mlとした。この溶液を実施例3(b)で使用したのと同じ逆相HPLCを用いて精製 (但し、グラジエント条件は次のとおり。: (B) 0%→(60分) 30%→(120分) 36%→(120分) 46%) を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 495mgを得た。

アミノ酸分析値: Asx (10.2), Gly* (11.0), Arg (10.3), Thr (10.1)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 12.83分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 28.62分

【0043】実施例11

コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール修飾 (Arg Gly Asp Thr),

実施例1(h)で調製した (Arg Gly Asp Thr), 300mgを、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH 8.21) 30mlに溶解させた後、コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (平均分子量約5000) 3.48g (アミノ基に対して5eq.)を加え、室温で2時間攪拌した。1N塩酸でpH 5.0に調製したのち、メンブランフィルター (0.45μm) で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を100mlとした。実施例10で使用したのと同じ条件で逆相HPLCを用いて精製後、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 581mgを得た。アミノ酸分析値: Asx (4.53), Gly* (5.00), Arg (4.51), Thr (4.62)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 14.23分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 29.28分

【0044】実施例12

コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール修飾 (Arg Gly Asp Thr),

実施例4(b)で調製した (Arg Gly Asp Thr), 120mgを、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH 8.21) 12mlに溶解させた後、コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (平均分子量約5000) 2.30g (アミノ基に対して5eq.)を加え、室温で3時間攪拌した。1N塩酸でpH 5.0に調製したのち、メンブランフィルター (0.45μm) で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を100mlとした。実施例3(b)で使用したときと同じ逆相HPLCを用いて精製 (但し、グラジエント条件は次のとおり。: (B) 0%→(60分) 35%→(120分) 41%→(120分) 51%) を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 236mgを得た。

アミノ酸分析値: Asx (2.88), Gly* (3.00), Arg (2.92), Thr (2.83)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 16.55分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 29.58分

【0045】実施例13

コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール修飾 (Arg Gly Asp Thr),

実施例3(b)で調製した (Arg Gly Asp Thr), 169mgを、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH 8.21) 16.9mlに溶解させた後、コハク酸モノメトキシポリエチレングリコール N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (平均分子量約5000) 1.40g (アミノ基に対して5eq.)を加え、室温で3時間攪拌した。1N塩酸でpH 5.0に調製したのち、メンブランフィルター (0.45μm) で不溶物を濾去後、蒸留水で希釈し、全容量を100mlとした。実施例3(b)で使用したのと同じ逆相HPLCを用いて精製 (但し、グラジエント条件は次のとおり。: (B) 0%→(60分) 30%→(360分) 42%→(60分) 48%) を行い、目的のフラクションを凍結乾燥して、表題化合物 204mgを得た。

アミノ酸分析値: Asx (7.28), Gly* (7.00), Arg (7.09), Thr (6.72)

*基準アミノ酸

逆相HPLC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 13.92分

GPC

分析条件は実施例6と同じ

保持時間: 29.01分

【0046】実施例14

(Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n=1,3,5,7,9,11)およびpoly(Arg-Gly-Asp-Thr)の癌転移抑制作用。

分子量の明確な (Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n=1,3,5,7,9,11) および、特開平2-174798号公報記載の方法と同様の方法で調製したRGDTのポリマーであるpoly(Arg-Gly-Asp-Thr)の癌転移抑制活性について、濱木らの方法(特開平2-174798号公報)に従い検討を行った。即ち、実施例1, 2, 3, 4, 5で合成したペプチドおよびpoly(Arg-Gly-Asp-Thr)を用い、これらの化合*

*物の癌転移抑制作用をマウスのB16-BL6メラノーマ細胞で検討した。まず、これらの化合物を各々500μgと非常に転移性の強い癌細胞としてB16-BL6メラノーマ細胞(24時間対数増殖期にあるもの、3×10⁴個)を各々PBS中で混合後、その0.2mlを一群5匹のC57BL/6の雄マウスに静脈注射した。投与14日後にマウスの肺の癌コロニー数を数えて、対照のPBS投与群と比較した。その結果を第1表に示す。この結果によれば、(Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n=3,5,7,9,11)およびpoly(Arg-Gly-Asp-Thr)の投与により、肺への癌転移は顕著に抑制された。また、(Arg-Gly-Asp-Thr)_n (n=5,7,9,11)においては、poly(Arg-Gly-Asp-Thr)に比べ、より強力に肺への癌転移を抑制した。

【0047】

【表1】

B16-BL6メラノーマ細胞の静脈注射で誘発された肺の実験的

癌転移に対するポリペプチドの抑制作用

| 投与化合物 | 投与量 (μg) | 14日後の肺への転移数 | | |
|----------------------|-------------|-------------|------|------------|
| | | 平均 | ± SD | (範囲) |
| PBS (未処理) | | 46 | ± 6 | (40-54) |
| (RDGT) ₁ | 500 | 36 | ± 14 | (22-52) |
| (RDGT) ₃ | 500 | 30 | ± 10 | (16-46) * |
| (RDGT) ₅ | 500 | 14 | ± 4 | (10-18) ** |
| (RDGT) ₇ | 500 | 12 | ± 6 | (6-22) * |
| (RDGT) ₉ | 500 | 16 | ± 6 | (8-20) ** |
| (RDGT) ₁₁ | 500 | 14 | ± 6 | (10-20) ** |
| poly(RDGT) | 500 | 26 | ± 10 | (14-40) * |

RGDT: Arg-Gly-Asp-Thr

* : P < 0.05, ** : P < 0.001

【0048】実施例15

(Arg-Gly-Asp-Thr)₁₁および、その高分子修飾体の癌転移抑制作用

実施例2, 6および10で合成したペプチドおよび高分子修飾ペプチドを用い、これらの化合物の癌転移抑制作用を、マウスのB16-BL6メラノーマ細胞で検討し

た。まず、これら化合物の40, 200および1000μg(蛋白含量)を、それぞれ3×10⁴個のB16-BL6メラノーマ細胞とPBS中で混合後、実施例14に示したのと同様の方法でマウスC57BL/6に投与して、癌の転移抑制作用を調べた。その結果を、第2表に示す。同表から明らかなとおり、(Arg-Gly-Asp-Thr)

に比べ、その高分子修飾体の投与により肺への癌転移 * [0049]
は極めて強力に抑制された。 * [表2]

B16-BL6メラノーマ細胞の静脈注射で誘発された肺の実験的
癌転移に対するペプチドおよび、高分子修飾ペプチドの抑制作用

| 投与化合物 | 投与量 (μ g) | 14日後の肺への転移数 |
|-----------|-------------------|------------------------|
| | | 平均 \pm SD (範囲) |
| PBS (未処理) | | 190 \pm 47 (48-85) |
| (RGDT) II | 1000 | 10 \pm 5 (0-14) * |
| | 200 | 127 \pm 28 (101-168) |
| | 40 | 156 \pm 34 (126-194) |
| PEG2- | 1000 | 0 * |
| (RGDT) II | 200 | 50 \pm 12 (38-64) * |
| | 40 | 118 \pm 43 (70-172) |
| PEG- | 1000 | 0 * |
| (RGDT) II | 200 | 68 \pm 8 (57-78) * |
| | 40 | 125 \pm 11 (125-140) |
| PEG2 | 3000 | 112 \pm 36 (78-145) |

(RGDT) II : (Arg-Gly-Asp-Thr) II, 実施例2で合成

PEG2-(RGDT) II : 実施例6で合成

PEG-(RGDT) II : 実施例10で合成

* ; P < 0.001

フロントページの続き

(72)発明者 池田 善治

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住
友製薬株式会社内

(72)発明者 小野 圭一

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住
友製薬株式会社内